

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSTGRADO

**Evaluación de la expresión de Ccna1, Cyp17, StAR y
Prm2 en la espermatogénesis de ratones Swiss
Rockefeller tratados con *Lepidium meyenii* Walp.
(maca)**

TESIS

para optar al grado académico de Magíster en Biología Molecular

AUTOR

José Manuel Gonzales Daga

ASESORA

Martha E. Valdivia Cuya

Lima-Perú

2010

Dedicatoria

A ti Pam, mi persona
favorita con todo mi
amor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mis padres, hermano y hermanas por todo su apoyo brindado durante mi formación profesional.

A mis amigos y compañeros del laboratorio por su colaboración en el desarrollo del trabajo.

A mi asesora de tesis por todo el apoyo brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica por el apoyo económico para la culminación del grado y el desarrollo de la tesis.

CONTENIDO

	PAG
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Lepidium meyenii</i> (maca)	3
2.2. Testosterona	5
2.3. Espermatogénesis y expresión génica	6
2.4. Ciclina A1 (<i>Ccna1</i>)	6
2.5. Citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa (<i>Cyp17</i>)	9
2.6. Proteína Reguladora de esteroidogenesis aguda (<i>StAR</i>)	10
2.7. Protaminas (<i>Prm2</i>)	11
3.- HIPOTESIS	13
4.- OBJETIVOS	13
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1. Animales	14
5.2. Preparación del extracto acuoso de maca	14
5.3. Tratamiento	16
5.4. Obtención de Muestras	16
5.5. Extracción de RNA Total	17
5.6. Síntesis de cDNA	18
5.7. Diseño de <i>Primers</i>	21
5.8. RT –PCR en Tiempo Real	22
5.9. Análisis de cuantificación relativa	25
5.10. Análisis estadístico	30

6.-	RESULTADO Y DISCUSIÓN	31
6.1.	<i>Pesos</i>	31
6.2.	<i>Concentración Espermática</i>	34
6.3.	<i>Expresión génica</i>	36
7.-	CONCLUSIONES	45
8.-	RECOMENDACIÓN	45
9.-	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

RESUMEN

Lepidium meyenii Walp (maca) (Brassicaceae), es empleada tradicionalmente por sus diversas propiedades, entre las que destacan la mejora en el desempeño sexual en humanos, ratas y ratones, además de mejorar la espermatogénesis. Sin embargo, el mecanismo de como la maca influye sobre la espermatogénesis es aún desconocido

En el presente estudio, ratones machos de edad adulta fueron tratados con el extracto acuoso de maca, durante periodos de 7, 14 y 21 días; al final de cada tratamiento se midieron los pesos, concentración espermática y se evaluó la expresión de ciclina A1 (*Ccna1*), citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa (*Cyp17*), protamina 2 (*Prm2*) y la proteína reguladora de esteroidogénesis aguda (*StAR*), genes involucrados en el proceso de espermatogénesis.

En los resultados se observó que la maca incrementó significativamente ($p < 0.05$) la concentración espermática en los 3 grupos tratados; además la expresión de los genes *Ccna1*, *Cyp17* y *Prm2* no fue afectada significativamente a diferencia de *StAR*, que muestra una regulación negativa en su expresión en los grupos de 7 y 14 días de tratamiento. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual la maca incrementa la concentración espermática, no está relacionado al incremento de la actividad meiótica, ni a la síntesis de testosterona, sino mas bien a la respuesta de algún componente con actividad androgénica presente en el extracto acuoso de maca, evidenciado por el efecto negativo sobre la expresión de *StAR*.

Estos resultados revalidan la importancia de maca como potenciador reproductivo, sin el riesgo del incremento de andrógenos, contraindicados para los casos de cáncer de próstata.

Palabras clave: *espermatogénesis, expresión génica, Lepidium meyenii* Walp., RT-PCR tiempo real, andrógenos.

ABSTRACT

Lepidium meyenii Walp. (maca) (Brassicaceae) is widely used as a folk medicine, for the ability to enhance the sexual performance in humans, rats and mice, besides to improve the spermatogenesis.

However, the way maca acts on spermatogenesis still unclear.

In this study, adult male mice were treated with maca aqueous extract during periods of 7, 14 and 21 days, after each treatment, physiological parameters were measured and the expression of cyclin A1 (*Ccna1*), cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (*Cyp17*), protamine 2 (*Prm2*) and steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) (genes involved in spermatogenesis), were recorded.

The results shows that maca increased significantly ($p < 0.05$) sperm concentration in the three treatment groups, plus *Ccna1*, *CYP17* and *Prm2* expression were not significantly affected, while *StAR*, shows a negative regulation on their expression in groups of 7 and 14 days of treatment. These results suggest, that the mechanism maca increases sperm concentration is not related to increased meiotic activity, or the synthesis of testosterone, but rather the response of a component with androgenic activity present in the aqueous extract of maca, evidenced by the negative effect on *StAR* expression.

These results re-enact the importance of maca as reproductive enhancer without running the risk of increased androgen contraindicated in cases of prostate cancer.

Keywords: *spermatogenesis, gene expression, Lepidium meyenii* Walp., *Real Time RT-PCR, androgens.*

1. INTRODUCCIÓN

Lepidium meyenii Walp (maca), es una Brassicacea oriunda de los Andes peruanos, que se cultiva principalmente en las regiones Suni y Puna de los departamentos de Junín y Pasco, entre los 3700 y 4500 m de altitud. Su domesticación y uso en la alimentación data de la época pre inca con la cultura Pumpush en la meseta del Bombón, departamento de Junín (Perú) (Chacón, 1997).

Su utilización se está popularizando como uno de los mejores alimentos naturales suplementarios del mundo, tanto en el país como en el extranjero, gracias a sus excelentes propiedades nutritivas y medicinales.

Entre sus propiedades más importantes encontramos su efecto positivo sobre la función sexual y el incremento significativo de espermatozoides (Gonzales *et al.*, 2001; Gonzales *et al.*, 2003a; Comhaire & Mahmoud, 2004; Bustos-Obregón *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2006a), al potenciar el proceso de la espermatogénesis incluso después de daño espermatogénico causado por pesticidas organofosforados (Bustos-Obregón *et al.*, 2005).

Diversas investigaciones realizadas aún no dejan en claro los mecanismos de como la maca influye sobre la espermatogénesis, que resulta en el incremento significativo de espermatozoides; algunos investigadores observaron variaciones en los niveles de testosterona en el suero de ratones tratados (Oshima *et al.*, 2003), sin embargo, otros investigadores no encontraron efectos sobre los niveles de las hormonas reproductivas, entre ellas la testosterona, en el suero de personas tratadas (Gonzales *et al.*, 2001; 2002; 2003b), mientras que Gonzales *et al.*, 2004; observó en ratas, que la testosterona en suero se incrementó al día 14 de tratamiento pero no a los 7 y 21 días.

Por otro lado, la maca muestra interesantes actividades biológicas y contienen compuestos (fitoestrógenos) cuyas actividades son similares a la testosterona (Valentová *et al.*, 2003; Bogani *et al.*, 2006), los cuales aparentemente son los que mejoran la eficacia reproductiva en ratas y humanos (Piacente *et al.*, 2002; Oshima *et al.*, 2003).

La transcripción reversa (RT) seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Tiempo Real es el método más sensible para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes (Steuerwald *et al.*, 2000; Livak *et al.*, 2001; Peirce *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2002b; Zhang *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006; Schefe *et al.*, 2006; Čikoš *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2007).

La cuantificación relativa usando el RT-PCR en tiempo real con detección de SYBR Green I, se empleó en el presente trabajo para cuantificar la expresión relativa de los genes que codifican para: ciclina A1 (*Ccna1*) esencial para la primera división meiótica en la espermatogénesis de ratones machos (Liu *et al.*, 1998), citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa (*Cyp17*), importante para la biosíntesis de cortisol y esteroides sexuales (Liu *et al.*, 2005a), la proteína reguladora de esteroidogénesis aguda (*StAR*), cuya expresión transcripcional es regulado por andrógenos (Houk *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005) y protamina 2 (*Prm2*) que es necesaria para la diferenciación de espermátide a espermatozoide (Rhim *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2003; Grzmil *et al.*, 2008), con el objetivo de evaluar la influencia del extracto acuoso de la maca sobre la espermatogénesis y ayude a entender el mecanismo de esta planta altoandina sobre éste proceso.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Lepidium meyenii* Walp. (maca)

Lepidium meyenii Walp conocida comúnmente como maca, es una herbácea de la familia Brassicaceae que se cultiva a 4500 msnm en los Andes Centrales de Sudamérica, desde el Perú, Bolivia y hasta el noroeste de Argentina (Gonzales *et al.*, 2001).

La parte usada de la maca es la raíz, tanto fresca como deshidratada, tradicionalmente se consume sancochada o asada, en forma de harina para preparar refrescos, postres, como ingrediente de ensalada de frutas, jugos y licor.

Las excelentes propiedades de la maca se deben a su rica composición que han sido investigados en laboratorios de universidades del país y del extranjero. En general, los diferentes análisis encuentran alrededor de 59% de carbohidratos, 14% de proteínas, 9% de fibras y 2% lípidos. Entre otros componentes se encuentran ácidos grasos esenciales como el linolénico y el oleico, flavonoides y saponinas (Dini *et al.*, 1994), esteroides, alcaloides (Cui *et al.*, 2003), derivados benzilados (Muhammad *et al.*, 2002) isotiocianatos, macamidas y glucosinolatos. Adicionalmente, Zhao *et al.*, (2005) determinaron la presencia de siete nuevas alcaloides que han sido encontradas únicamente en *L. meyenii*. Cui *et al.*, (2003) demostraron la presencia de alcaloides imidazólicos: lepidilina 1 y lepidilina 2, con efecto citotóxico sobre 8 líneas celulares transformadas; sin embargo, es poco lo que se conoce sobre los mecanismos de acción de estos metabolitos y sobre todo, su asociación con los efectos atribuidos a la planta (Dini *et al.*, 2002; Muhammad *et al.*, 2002; Ganzera *et al.*, 2002; Valentová *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).

La medicina tradicional le atribuye propiedades afrodisíaca, reguladora, inmunoestimulante, energizante y antiartrítica (Obregón, 1998). Diferentes estudios evidenciaron sus propiedades nutricionales energizantes, antiestresantes, antidepresivos, así como la mejora en el crecimiento y la sobrevivencia (Valentová *et al.*, 2003; Rubio *et al.*, 2006b; Wang *et al.*, 2007), también reconocen su efecto sobre: la reducción del tamaño de la próstata en ratas con hiperplasia prostática inducida por enantato de testosterona (Gonzales *et al.*, 2005a; 2006; 2007), el deseo sexual (Gonzales *et al.*, 2002), la función sexual y el incremento significativo de espermatozoides (Gonzales *et al.*, 2001; Gonzales *et al.*, 2003a; Comhaire y Mahmoud, 2004; Bustos-Obregón *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2006a), potenciando la espermatogénesis, incluso después de daño espermatogénico causado por pesticidas organofosforados (Bustos-Obregón *et al.*, 2005) o previniendo la disrupción espermatogénica inducida por acetato de plomo en ratas (Rubio *et al.*, 2006a).

Los alcaloides de la maca, esteroides, glucosinolatos, isotiocianatos y macamidas probablemente son los responsables de esta aptitud de la maca para actuar como un potenciador de la fertilidad, afrodisíaco, adaptógeno, inmunoestimulante, anabólico e influencia en el balance hormonal (Valentová *et al.*, 2003).

Tratamientos con maca incrementaron significativamente los niveles de testosterona en el suero de ratones tratados por 30 días (Oshima *et al.*, 2003), otros investigadores encontraron que la maca no afectó los niveles de hormonas reproductivas (incluyendo testosterona) en el suero de personas tratadas por varias semanas (Gonzales *et al.*, 2001; 2002; 2003b); mientras que en ratas tratadas con 2 g/kg de extracto acuoso de maca, se observó que la testosterona, en el suero, se incrementó al día 14 pero no a los días 7 y 21 de tratamiento (Gonzales *et al.*, 2004), en otras

observaciones, extractos etanólicos de maca, no produjeron diferencias en los niveles de testosterona en el suero después de 21 días de tratamiento (Gonzales *et al.*, 2003a).

Por otro lado, la maca muestra interesantes actividades biológicas y contienen compuestos (fitoestrógenos) cuyas actividades son similares a la testosterona (Valentová *et al.*, 2003; Bogani *et al.*, 2006), los cuales aparentemente son los que mejoran la eficacia reproductiva en ratas y humanos (Piacente *et al.*, 2002; Oshima *et al.*, 2003), tal como se muestran en estudios donde el extracto acuoso de esta planta, es capaz de incrementar el número de espermatozoides en los túbulos seminíferos (Zheng *et al.*, 2000).

2.2. Testosterona

La testosterona es una hormona esteroidea (andrógeno), producida por las células de Leydig del intersticio testicular bajo la influencia de la hormona luteinizante (LH) que juega un papel esencial en la regulación de la espermatogénesis; actúa sobre espermatoцитos y espermátides (Schulz *et al.*, 1989) y ayuda a las células de Sertoli en la maduración de las células germinales masculinas y la producción de espermatozoides (Fix *et al.*, 2004). En particular, señalan su aparente importancia para completar la espermiogénesis (Sun *et al.*, 1990 citado por McLachlan *et al.*, 1996; McLachlan *et al.*, 1994).

O'Donnell *et al.*, (1994) encontraron un sitio específico de acción de la testosterona en la conversión de espermátides redondas a elongadas entre los estadios VII y VIII del ciclo espermatogénico de la rata, determinando que dicha conversión es altamente dependiente de testosterona; y que en ausencia de ésta, las espermátides redondas no terminan la espermiogénesis, al observar que éstos se detienen en un estado específico de

espermátides redondas en los estadios VII y VIII (O'Donnell *et al.*, 1996); sin embargo, Johnston *et al.*, (2001) determinaron que las células germinales no requieren de receptores androgénicos funcionales para completar la espermatogénesis, con lo cual la acción de la testosterona sería a través de las células somáticas como las células de Leydig, las peritubulares y las células de Sertoli.

2.3. Espermatogénesis y expresión génica

Es conocido que en el adulto, la espermatogénesis se caracteriza por la continua maduración de las células germinales hacia el centro de los túbulos seminíferos, proliferación mitótica de espermatogonias, división meiótica de espermatocitos, diferenciación de las espermátides y finalmente, la liberación de espermatozoides hacia el lumen del túbulo (Print y Loveland, 2000).

La espermatogénesis es un proceso ordenado durante el cual las células germinales entran en fases mitóticas, meióticas y postmeióticas (Lele y Wolgemuth, 2004). El programa de expresión génica requerido para este proceso es altamente controlado y estrechamente regulado, gobernado por múltiples e importantes factores (Lele y Wolgemuth, 2004; Bäumer *et al.*, 2007).

2.4. Ciclina A1 (*Ccna1*)

Las ciclinas son unidades reguladoras del complejo Quinasas dependientes de ciclina (Cdk) y son expresados periódicamente durante el ciclo celular; se han determinado al menos 10 clases y se denominan como ciclinas de la A a la I y T, además de múltiples miembros de la familia de ciclinas de tipo A, B y D (Lele y Wolgemuth, 2004).

En los organismos superiores hay dos ciclinas tipo A, ciclina A1 (*Ccna1*) y ciclina A2 (*Ccna2*). En ratones, ambas son expresadas en las células germinales masculinas, aunque durante distintos estadios de diferenciación, sugiriendo que son estrechamente regulados y pueden tener distintas funciones (Sweeney *et al.*, 1996; Ravnik *et al.*, 1999).

Ccna1 difiere de otras ciclinas en su patrón de expresión, que está predominantemente restringido a la línea celular germinal. Este patrón de expresión ha sido investigado en ratones machos y comparado con el de *Ccna2*. Mientras que, *Ccna2* se expresa exclusivamente durante la proliferación mitótica, antes del ciclo meiótico y durante la fase S pre-meiótica. La expresión de *Ccna1* está restringida a células meióticas. Específicamente, el mRNA de *Ccna1* y su producto proteico son detectados inicialmente en espermátocitos en el paquíteno tardío con un incremento máximo de la proteína durante el diploteno (Sweeney *et al.*, 1996; Ravnik y Wolgemuth, 1999; Van der Meer *et al.*, 2004; Wolgemuth *et al.*, 2004) (Figura 1), participando en la regulación de otras proteínas quinasas o fosfatasas, críticas para la transición de la fase G2 – M en el ciclo celular (Liu *et al.*, 2000).

La disrupción de la expresión del gen *Ccna1* de ratón resulta en la infertilidad y en el completo detenimiento espermatogénico antes de la primera división meiótica (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Bäumer *et al.*, 2007).

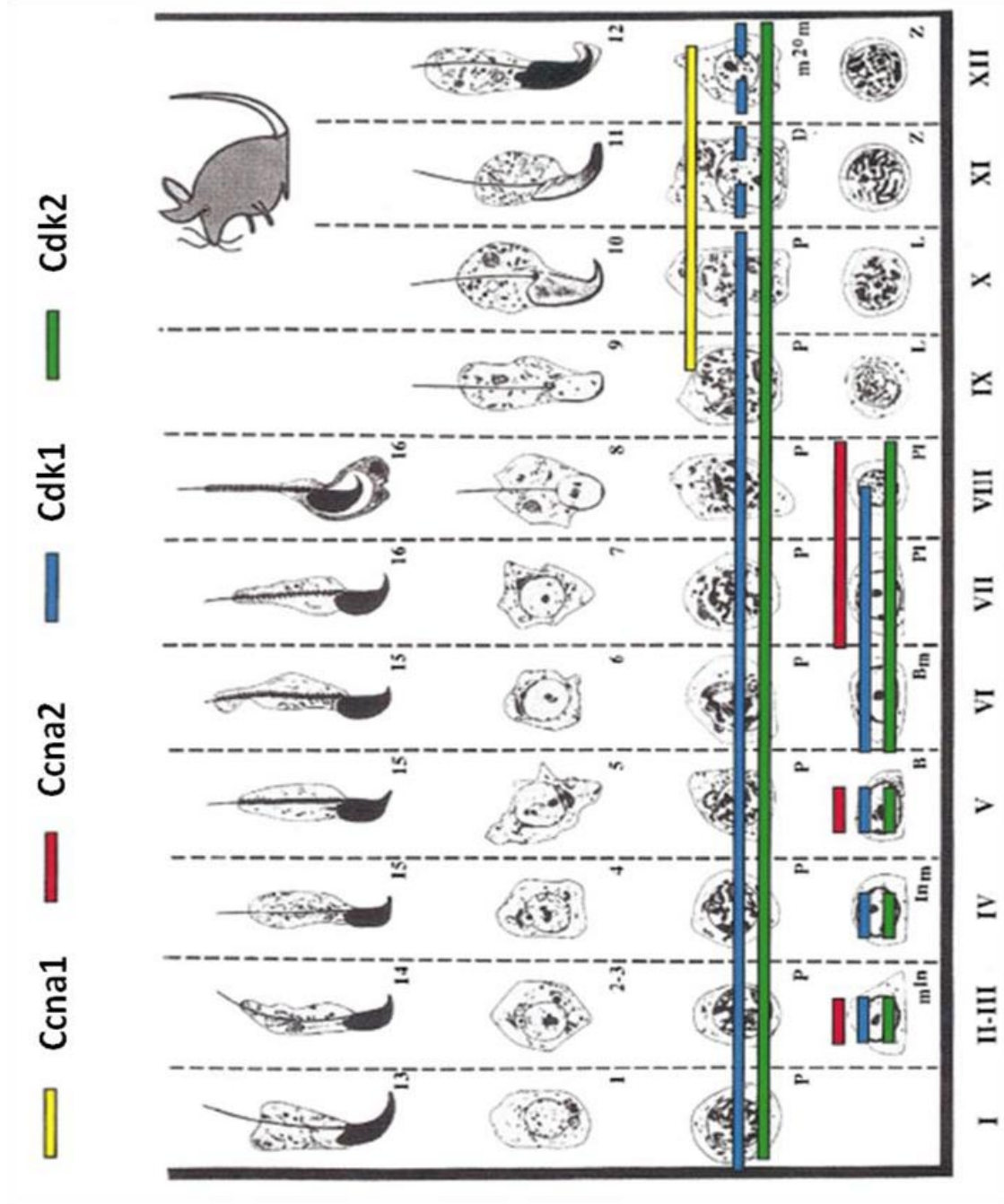


Figura 1. Ciclo espermático de ratón donde se muestran la expresión de los genes ciclina 1 y 2 (*Ccna1* y *Ccna2*) y Quinasas dependientes de ciclina 1 y 2 (*Cdk1* y *Cdk2*) (Ravnik et al., 1999)

2.5. Citocromo P450 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa (Cyp17)

El gen *Cyp17* codifica una enzima microsomal que cataliza dos actividades distintas, la hidroxilación y como liasa, críticos para la formación de andrógenos (Liu *et al.*, 2005b); la primera actividad enzimática hidroxila la pregnenolona y progesterona en la posición del C₁₇ para generar 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona, mientras que la segunda actividad enzimática cliva el C₁₇-C₂₀ ligado de 17 α -hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona para formar dehidroepiandrosterona y androstenediona respectivamente (Liu *et al.*, 2005b; Akhtar *et al.*, 2005). La Androstenediona es el precursor inmediato de la testosterona (Payne, 1990) (Figura 2).

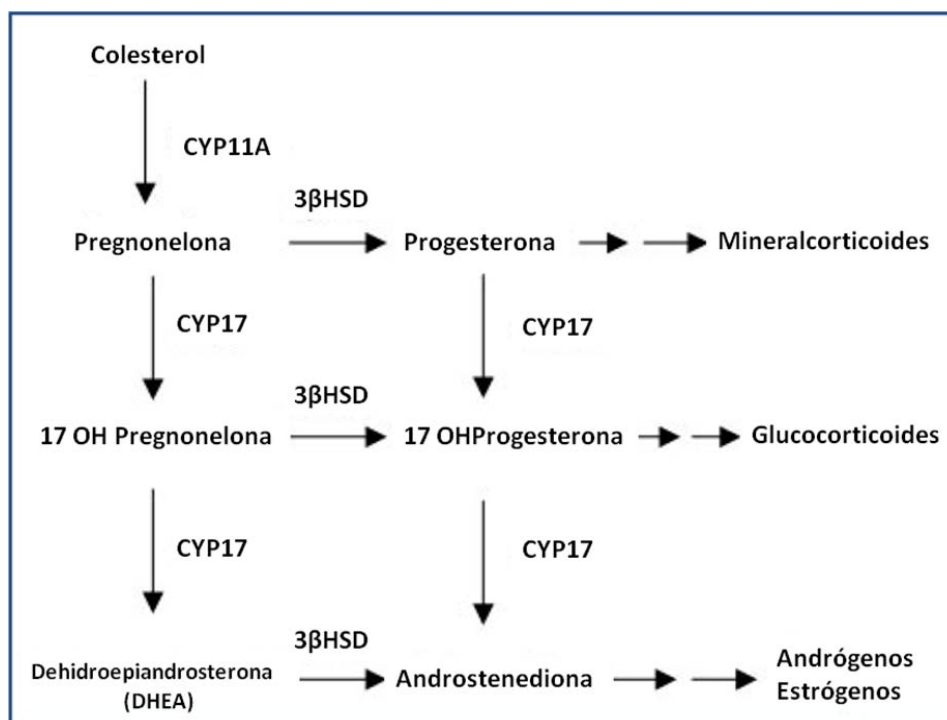


Figura 2. Vía de la esteroidogénesis en donde interviene CYP17 (Liu *et al.*, 2005a).

La reducción de los niveles de mRNA de *Cyp17* en células de Leydig, en ratones quiméricos, mostró una disminución del 80% en los niveles intratesticulares y séricos de testosterona, en concordancia con el rol crítico de esta enzima en la biosíntesis de andrógenos (Liu *et al.*, 2005a).

2.6. Proteína reguladora de esteroidogénesis aguda (StAR)

La mayoría de los esteroides se sintetizan en un grupo de tejidos especializados en las gónadas, glándulas suprarrenales, hígado, placenta y el cerebro a partir de un precursor común, el colesterol, que sirve como columna vertebral de la molécula de esteroides.

El transporte de colesterol en la membrana mitocondrial interna, en donde ocurren los pasos iniciales de la síntesis de hormonas esteroides, constituye el paso limitante en este proceso. Una vez entregado a la membrana mitocondrial interna, el colesterol es modificado por un grupo de enzimas especializadas para producir las diversas hormonas esteroides (Houk *et al.*, 2004).

La membrana mitocondrial externa no supone ningún obstáculo para el colesterol, sin embargo, el espacio entre la membrana mitocondrial externa e interna es acuosa y sólo permite el paso de moléculas solubles en agua, formando así una barrera efectiva para los compuestos lipofílicos como el colesterol.

La proteína reguladora de esteroidogénesis aguda (StAR), de 37kDa de peso molecular, supera esta barrera mediante el transporte de colesterol a la membrana mitocondrial interna (Stocco, 2001). Como resultado de la

unión de la hormona trófica a su receptor en las células esteroideogénicas y posterior señalización del segundo mensajero, AMPc, la síntesis de hormonas esteroideas es inducida por la aguda inducción de la transferencia de colesterol a la membrana mitocondrial interna por la actividad de StAR y posteriormente por un aumento en la expresión de enzimas esteroideogénicas, incluyendo StAR (Houk *et al.*, 2004).

Por otro lado, en estudios realizados por Houk *et al.*, (2004) relacionados a la regulación de la expresión de este gen, emplearon flutamida, un antagonista del receptor de andrógeno, el cual mejoró la expresión de mRNA de *StAR*, mientras que dihidrotestosterona, un potente agonista del receptor de andrógeno, atenuó esta respuesta, sugiriendo que los andrógenos inhiben la expresión de mRNA de *StAR* por retroalimentación, a nivel transcripcional.

Se encontró que el tratamiento con testosterona reprime fuertemente la expresión de *StAR* en las células de Sertoli, represión también observada en las células de Leydig, lo que podría indicar que la regulación de *StAR* por testosterona es un evento no específico a un tipo celular (Zhou *et al.*, 2005).

2.7. Protaminas (*Prm*)

Durante la espermiogénesis, las espermátides haploides sufren un complejo cambio morfológico y fisiológico hacia el espermatozoide. Este proceso incluye el remodelamiento de la cromatina mediado por el reemplazo de

las histonas por proteínas de transición y protaminas (Grzmil *et al.*, 2008)

Las protaminas son proteínas con alto contenido de aminoácidos de carga positiva, particularmente arginina (48% en protaminas humanas) (Oliva, 2006), involucradas en la condensación de la cromatina del espermatozoide. En el ratón, los genes de protamina son transcritos post-meioticamente en espermátides redondas (Peschon *et al.*, 1987), estas proteínas son muy importantes en la diferenciación de espermátide a espermatozoide (Rhim *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2003; Grzmil *et al.*, 2008)

En la actualidad se ha descrito un gen de protamina que es expresado en la mayoría de mamíferos, la protamina 1 (*Prm1*), pero en algunos mamíferos, incluyendo ratones y humanos se ha descrito un segundo gen denominado protamina 2 (*Prm2*) (Corzett *et al.*, 2002); sin embargo, ambos son igualmente importantes para la formación de espermatozoides funcionales (Cho *et al.*, 2001; 2003).

Tres de los genes involucrados en el remodelamiento de la cromatina codifican proteínas cromosomales básicas, PRM1, PRM2 y la proteína de transición nuclear 2 (TNP2). Altos niveles de mRNA de *Prm1*, *Prm2* y *Tnp2* son expresados en espermátides y guardados en un estado translacionalmente inactivos por aproximadamente 6 a 8 días hasta la diferenciación celular a espermátides elongadas (Peschon *et al.*, 1987; Grzmil *et al.*, 2008).

3. HIPÓTESIS

La expresión de *Ccna1*, *Cyp17*, *StAR* y *Prm2*, genes involucrados en el proceso espermatogénico de ratones Swiss Rockefeller, es influenciada por el extracto acuoso de maca.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto del extracto acuoso de la maca sobre la expresión de genes involucrados en el proceso de espermatogénesis de ratones Swiss Rockefeller.

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto del extracto acuoso de maca sobre la expresión del gen *Ccna1* en ratones Swiss Rockefeller.
2. Determinar el efecto del extracto acuoso de maca sobre la expresión del gen *Cyp17* en ratones Swiss Rockefeller.
3. Determinar el efecto del extracto acuoso de maca sobre la expresión del gen *StAR* en ratones Swiss Rockefeller.
4. Determinar el efecto del extracto acuoso de maca sobre la expresión del gen *Prm2* en ratones Swiss Rockefeller.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Animales

Para el trabajo se emplearon 45 ratones (*Mus musculus*) machos de 7 a 8 semanas de edad, de la cepa Swiss Rockefeller, mantenidos en condiciones fisiológicas: a una temperatura de 25 a 27°C, con libre acceso a la comida balanceada, agua *ad libitum* y un fotoperiodo de 14/10 horas luz/oscuridad.

5.2. Preparación del extracto acuoso de maca

En este trabajo fue utilizado el morfotipo negro (Figura 3), ya que mostró tener más efectos benéficos sobre la concentración y motilidad espermática en epidídimo (Gonzales *et al.*, 2006). Las raíces de la maca fueron obtenidas en la ciudad de Carhuamayo Junín, a más de 4000 metros de altitud (Junín, Perú).



Figura 3. Raíces de *Lepidium meyenii* Walp. (maca), morfotipo Negro.

El extracto de las raíces de la maca se preparó con agua, de manera similar al empleado para el consumo (Sandoval *et al.*, 2002).

En resumen, las raíces fueron lavadas con agua, conteniendo hipoclorito de sodio (NaOCl, 1%), y secados en un horno convencional a 60°C por 24 h (Figura 4); luego fueron pulverizados y 100 g de este fue diluido en 500 ml de agua destilada y posteriormente hervido durante 30 min. La preparación fue mantenida en frío y filtrada; este extracto filtrado fue guardado en tubos cerrados a 4°C hasta su uso (Gonzales *et al.*, 2004; Bustos-Obregón *et al.*, 2005; Bustos-Obregón *et al.*, 2007).



Figura 4. Las raíces de maca secados en el horno a 60° C por 24 horas.

5.3. Tratamiento

Se tuvieron 4 grupos de animales: los grupos tratados T₇, T₁₄ y T₂₁; a los que les administró 666,6 mgkg⁻¹ de extracto acuoso de maca vía oral por 7, 14 y 21 días respectivamente (Bustos-Obregón *et al.*, 2007) y el control (C) tratado con agua destilada (Figura 5).



Figura 5. Administración del extracto acuoso de maca a los ratones.

5.4. Obtención de Muestras

Luego de cada tratamiento, los ratones fueron pesados y sacrificados por dislocación cervical, posteriormente se aislaron los testículos y epidídimos, los cuales también fueron pesados, ambos testículos y un epidídimo fueron colocados en Trizol dentro de un criovial (100mg de tejido/ml) y almacenados a una temperatura de -196C° en nitrógeno líquido hasta la extracción de RNA; mientras que del segundo epidídimo se obtuvo los espermatozoides para medir la concentración espermática.

5.5. Extracción de RNA

La extracción del RNA se realizó con Trizol, según el protocolo establecido por Invitrogen. En resumen, el protocolo consistió en homogenizar el testículo con 1 ml de Trizol, luego del cual fue centrifugado a 14 000 g por 10 min a 2-8 °C; fue eliminado el pellet (resto de tejido) y el sobrenadante se incubó a una temperatura de 15-30°C por 5 min y posteriormente se le agregó 200 µl de cloroformo, homogenizando en vortex, se incubó de 2 a 3 min a una temperatura de 15-30°C, luego se centrifugó a 14000 g por 15 min a 2-8 °C. Después de la centrifugación, la mezcla quedó separada en la parte inferior la fase fenol-cloroformo de coloración rojiza, una interfase blanca y una fase superior acuosa incolora (Figura 6). El RNA se ubica exclusivamente en la fase acuosa, el cual fue precipitado con 0.5 ml de alcohol isopropílico por 40 a 50 inversiones, seguidamente la mezcla se incubó por 10 min a 15-30°C y se prosiguió a la centrifugación a 14 000 g por 10 min a 2-8°C. El sobrenadante se eliminó y el pellet (RNA) se lavó con etanol al 75% frío, para finalmente se disolvió en agua miliQ libre de RNAsas.

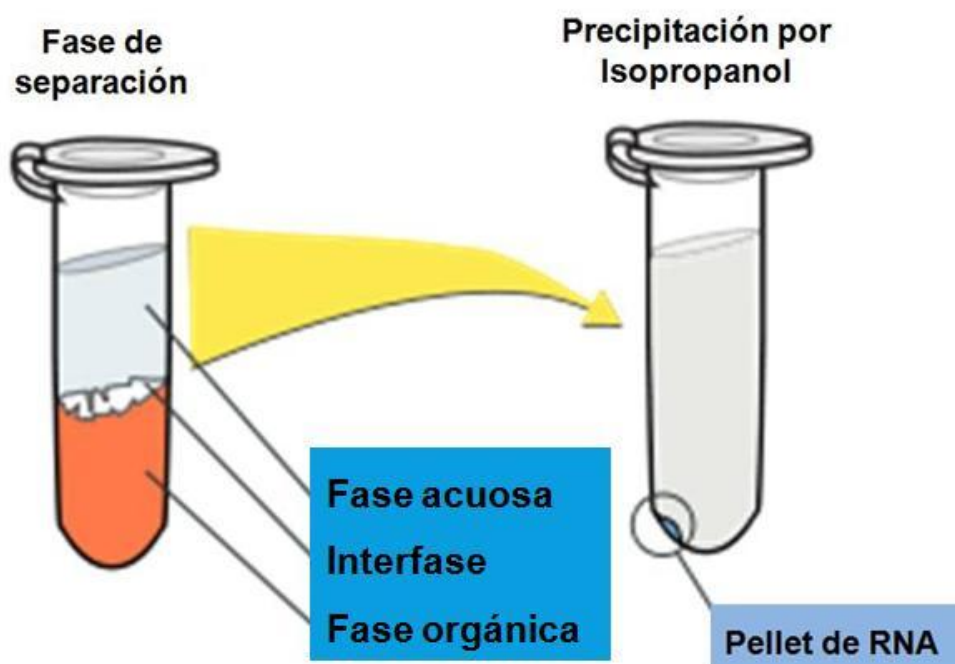


Figura 6. Proceso de aislamiento de RNA por Trizol.

5.6. Síntesis de cDNA

Una vez obtenido el RNA se procedió a remover el DNA contaminante mediante el uso del Kit DNA-freeTM de Ambion, según el protocolo descrito por Ambion. Se añadió 5 µl del buffer DNasa I 10X y 1 µl de DNasa I recombinante (rDNasa I) a 50 µl de RNA se mezcló e incubó a 37°C por 20-30 min, posteriormente se le adicionó el inactivador de DNasa, incubándolo por 2 min a temperatura ambiente, seguidamente se centrifugó a 10 000 g por 1,5 min, y se transfirió el RNA a otro tubo nuevo (Figura 7).

DNA-free™ Procesamiento

Agregar reactivo de digestión DNAsa



1. Agregar 10% del volumen 10X del Bufer DNAsa I al RNA y mezclar.

Incubar



2. Incubar a 37°C por 20 a 30 min.

Agregar reactivo de inactivación de DNAsa



3. Agregar el reactivo de inactivación de DNAsa resuspendido y mezclar bien.

Incubar y mezclar



4. Incubar por 2 min a temp ambiente, ezclando ocasionalmente.

Centrifugar y Transferir el RNA



5. Centrifugar a 10 000 g por 1,5 min y transferir el RNA a un tubo nuevo.

Figura 7. Proceso de remoción de DNA. Kit DNA-free™ de Ambion.

A partir del RNA aislado libre de DNA contaminante, se procedió a la síntesis del cDNA, para lo cual se empleó el Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR de Invitrogen® según el protocolo descrito. Brevemente, se mezcló 1 µl de RNA con 1 µl de los *primers* de oligo(dt), 1 µl de la mezcla de dNTPs y 7 µl de agua tratada con DEPC; ésta mezcla se incubó por 5 min a 65°C y luego se colocó en hielo por al menos 1 min. Luego se adicionó el master mix para la síntesis de cDNA, el cual contiene 2 µl de buffer RT 10X, 4 µl de 25 mM de MgCl₂, 2 µl de 0.1 M DTT, 1 µl de RNasaOUT. (40 U/µl) y 1µl del SuperScript. III RT (200 U/µl), se incubó por 50 min a 50°C, terminando la reacción a 85°C por 5 min y finalmente se le añadió la RNasa H, incubando a 37°C por 20 min, asegurándose así de remover el RNA; el cDNA se almacenó a –20°C hasta su uso para su cuantificación (Figura 8).

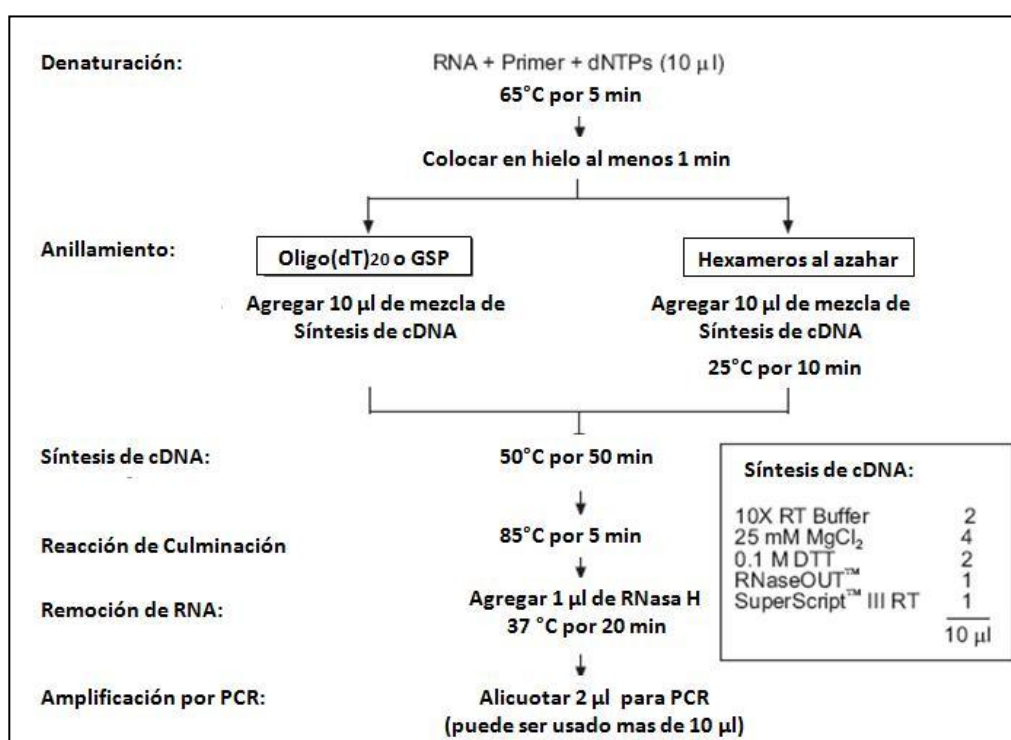


Figura 8. Resumen del proceso de síntesis de cDNA a partir de RNA. Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR de Invitrogen.

5.7. Diseño de Primers

El diseño de los *primers* usados para el trabajo fue realizado mediante el software “ProbeFinder” que permite diseñar los *primers* para ensayos de PCR en tiempo real, de manera fácil y rápida, para los genes blancos elegidos. El software selecciona un óptimo juego de *primers* del gen específico del *Universal ProbeLibrary for Mouse* de Roche Applied Science, un servicio online gratuito (<http://www.universalprobelibrary.com>) (Figura 9) (Tabla 1).

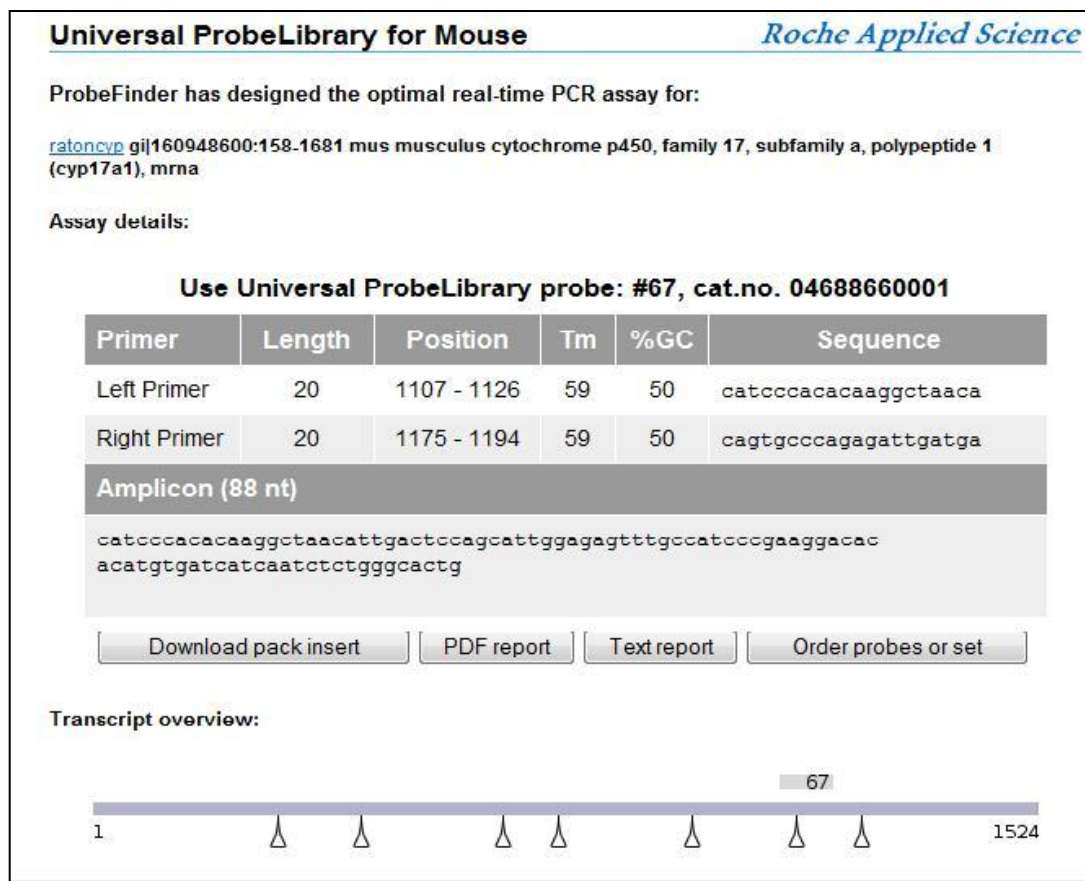


Figura 9. Resultado del diseño de *primers* mediante el software ProbeFinder de Roche Applied Science.

Tabla 1. Secuencias de primers empleados para RT-PCR en tiempo real

Gen		Primers
<i>Ccna1</i>	F	5'- cagatgtgattaacgtaacggagt - 3'
	R	5'- agtgagccttgggtctgtgt - 3'
<i>CYP17a1</i>	F	5'- catccacacacaaggctaaca - 3'
	R	5'- cagtgccagagattgatga - 3'
<i>StAR</i>	F	5'- ttgggcataactcaacaacca - 3'
	R	5'- acttcgtccccgttctcc - 3'
<i>Prm 2</i>	F	5'- cagaaggcggaggagacac - 3'
	R	5'- ctctccttcgggatcttct - 3'
<i>Act (Housekeeping)</i>	F	5'- gggtcagaaggattcctatg - 3'
	R	5'- ggtctcaaacatgatctggg - 3'

5.8. RT-PCR en Tiempo Real

La transcripción reversa (RT) seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Tiempo Real, es el método más sensible para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes (Steuerwald *et al.*, 2000; Livak *et al.*, 2001; Peirce *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2002b; Zhang *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006; Schefe *et al.*, 2006; Čikoš *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2007). La cuantificación de ácidos nucleicos, se ha simplificado bastante por el desarrollo de éste método en el cual la señal fluorescente que refleja la acumulación del producto de PCR es detectado en cada ciclo de amplificación (Čikoš *et al.*, 2007), el fluorescente ampliamente aplicado es el Syber green I por su capacidad de unirse a la doble cadena de DNA (Steuerwald *et al.*, 2000; Zipper *et al.*, 2004).

En las aplicaciones biológicas, para examinar la expresión génica, no es necesario conocer la cantidad inicial absoluta del

transcripto (el número de moléculas en la muestra). La cuantificación relativa describe el cambio en la expresión del gen blanco relativo a un gen de control interno conocido como control o “housekeeping” (Livak *et al.*, 2001; Čikoš *et al.*, 2007).

La RT-PCR en tiempo real cuantitativo, es un método aplicado en diversas investigaciones en medicina (Dötsch *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2006), cáncer (Peirce *et al.*, 2001; Schostak *et al.*, 2006), toxicología (Shi *et al.*, 2007), desarrollo (Steuerwald *et al.*, 2000).

Nuestro gen de control interno (housekeeping) será la actina (*Act*) (Dötsch *et al.*, 1999; Steuerwald *et al.*, 2000; Peirce *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2007).

La RT-PCR en tiempo real se realizó con el sistema LightCycler 2.0 de *Roche Applied Science*, en donde el producto de PCR puede ser detectado y medido por la señal fluorescente del SYBR Green I. El principio de esto es que el SYBR Green I se une al surco menor de la doble hélice del DNA y se intercala en la hélice del DNA (Steuerwald *et al.*, 2000; Zipper *et al.*, 2004); el colorante por sí solo presenta una fluorescencia muy baja; sin embargo, a 530nm de longitud de onda, mejora cuando se une al DNA. Por ello, durante la PCR, el incremento de la fluorescencia del SYBR Green I es directamente proporcional a la cantidad de DNA doble cadena generado y dicha emisión es detectado por el filtro óptico de sistema LightCycler 2.0.

El protocolo que se usó en el sistema SYBR Green I fue una mezcla de reacción de 20 µl de PCR que contenía: 2 µl de cDNA de la reacción de RT, 1,4 µl de de MgCl₂ (1,5mM), 2 µl de cada *primer* (0.5 µM), 2 µl del Master DNA SYBR Green I (Roche) y 10,6 µl de agua de grado molecular, fueron agregados a los capilares y

cargados al equipo LightCycler 2.0 de *Roche Applied Science*. Nuestras condiciones térmicas fueron diseñadas para la obtención de datos (detección de fluorescencia), en cada ciclo de amplificación. Además se aplicó la curva de disociación o “*curva de melting*” que determina la especificidad del producto amplificado definido por la temperatura de disociación de cada juego de *primers* correspondiente a cada gen evaluado (Figura 10).

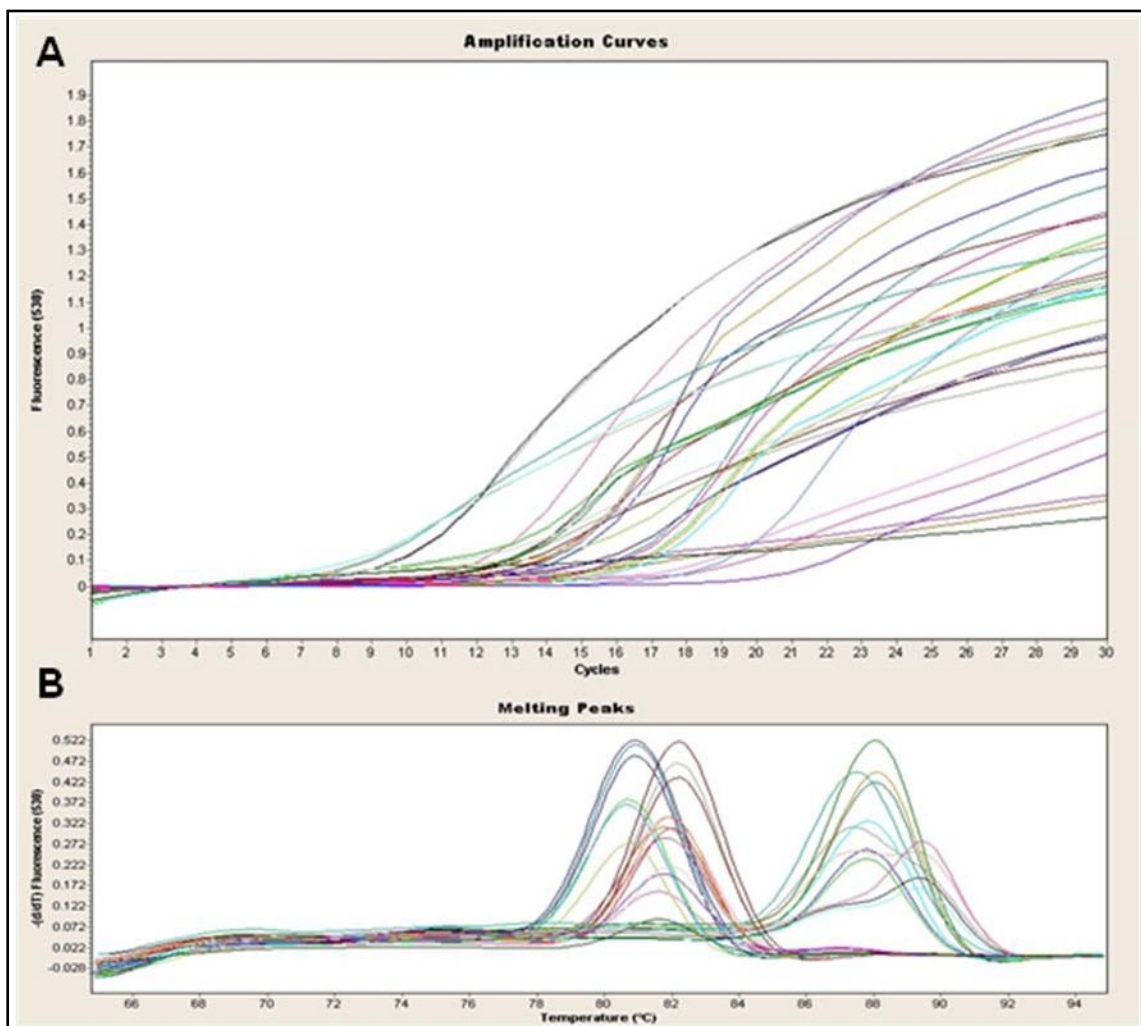


Figura 10. Curvas de amplificación observadas durante la amplificación de las muestras con los 5 juegos de *primers* para los genes *Ccna1*, *Cyp17*, *StAR*, *Prm2* y *Act* en el LightCycler 2.0 (A); curvas de “melting” para cada amplificado obtenido después de cada amplificación para determinar la especificidad del amplificado y descartar la presencia de contaminantes (B).

A continuación en la tabla 2 se presenta el programa utilizado para la cuantificación de los cuatro genes evaluados:

Tabla 2. Temperaturas y ciclos empleados para cuantificación relativa por RT-PCR en tiempo real.

	Ciclos	Temperaturas (°C)	Tiempo (s)	Rampa (°C/s)	Medición de fluorescencia
Desnaturalización	1	96	0	20	no
		95	0	20	no
Amplificación	30	56	10	20	no
		72	10	20	simple
		95	0	20	no
Disociación	1	65	15	20	no
		95	0	0.02	continua
Enfriamiento	1	40	30	20	no

5.9. Análisis de cuantificación relativa

El método comparativo de ciclo de Umbral CT (cycle threshold), y la curva estándar son usados comúnmente para la evaluación de la cuantificación relativa (Dötsch *et al.*, 1999; Steuerwald *et al.*, 2000; Livak *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007); sin embargo, presentan ciertas limitaciones, ya que este método se basa en varios supuestos, incluyendo que la eficiencia de amplificación (E) del gen blanco y el de referencia son iguales y que además presentan una eficiencia constante cercana a 1 en la fase exponencial de la PCR (Liu *et al.*, 2002a).

Liu *et al.*, (2002b) encontraron que la eficiencia de amplificación del PCR usualmente no es cerca a 1, y que las eficiencias de amplificación del gen blanco y el de referencia no siempre son aproximadamente iguales. Esto indica que los

parámetros de la cinética del PCR en tiempo real varían en reacciones individuales, incluso para el mismo gen. Por ello, Liu *et al.*, (2002a) plantearon una cuantificación más aguda, al considerar de la cinética de reacción de cada individuo. Así por ejemplo, la eficiencia de la amplificación en la primera fase exponencial de cada reacción fue calculada a partir de la cinética de reacción individual, en lugar de asumir una constante ($E=1$) y una idéntica eficiencia de amplificación para todas las reacciones.

Liu *et al.*, (2002b) desarrollaron un método cuantitativo basado en la eficiencia de amplificación, que tiene como base, la evaluación de la cinética en la fase exponencial inicial de cada reacción de PCR en tiempo real.

Se aplicó un modelo matemático *sigmoidal* que ajusta adecuadamente todo el proceso cinético de PCR en tiempo real, este modelo fue elegido para la evaluación de la expresión cuantitativa relativa de los genes problema en el presente trabajo.

Liu *et al.*, (2002a) plantearon la siguiente simulación del método R_n vs Ciclo que fue ajustada con la siguiente ecuación usando (SigmaPlot, versión 5.0, SPSS, Richmond, CA, USA)

$$R - R_b = \frac{R_{\max}}{1 + \exp(-((n - n_{1/2})/k))} \quad (1)$$

Donde R es la fluorescencia en el PCR en tiempo real, R_n es la fluorescencia sin *background* en el PCR en tiempo real al ciclo n , R_b es la fluorescencia *background*, R_{\max} es la fluorescencia máxima observada, $n_{1/2}$ es el número de ciclos en el cual la fluorescencia es

la mitad de R_{\max} y k es una constante que influye en la amplitud de la zona entre mesetas.

Además, expresaron a la eficiencia mediante la siguiente fórmula:

$$E_n = \frac{R_n - R_{n-1}}{R_{n-1}} \quad (2)$$

Donde, E_n es la eficiencia de la amplificación al ciclo n y donde R_n y R_{n-1} son las fluorescencias al ciclo n y $n - 1$. De la combinación simplificada de las ecuaciones (1) y (2) y asumiendo que $R_0 = 0$, obtienen la siguiente ecuación:

$$E_n = \left\{ 1 + \exp \left(- \frac{n - 1 - n_{1/2}}{k} \right) \right\} / \left\{ 1 + \exp \left(- \frac{n - n_{1/2}}{k} \right) - 1 \right\} \quad (3)$$

Para los propósitos de cuantificación relativa en PCR en tiempo real, Liu *et al.*, (2002a) determinaron que la cantidad inicial de los transcritos, representado por R_0 en este método matemático es definido ajustando $n=0$ en las ecuaciones (1) y (3) y la expresaron con la siguiente fórmula:

$$R_0 = \frac{R_{\max}}{1 + \exp(n_{1/2}/k)} \quad (4)$$

R_0 : valor inicial de moléculas presentes en cada una de las muestras

Por lo tanto, para realizar el análisis de cuantificación relativa de la expresión de *Ccna1*, *CYP17a1*, *StAR* y *Prm 2*, se procedió a la determinación del R_0 de cada reacción de PCR en tiempo real, incluyendo el de *Act* (gen de control). Para dicho propósito, se empleó el programa SigmaPlot versión 10.0, con el cual se obtuvo el gráfico de la cinética de cada reacción de PCR (Figura 11), de donde derivaron los valores de R_{max} , $n_{1/2}$ y k , a partir de los datos de fluorescencia, obtenidos de las reacciones del PCR en tiempo real (para cada individuo y gen evaluado) (Figura 12), y se obtuvo los R_0 mediante la ecuación (4).

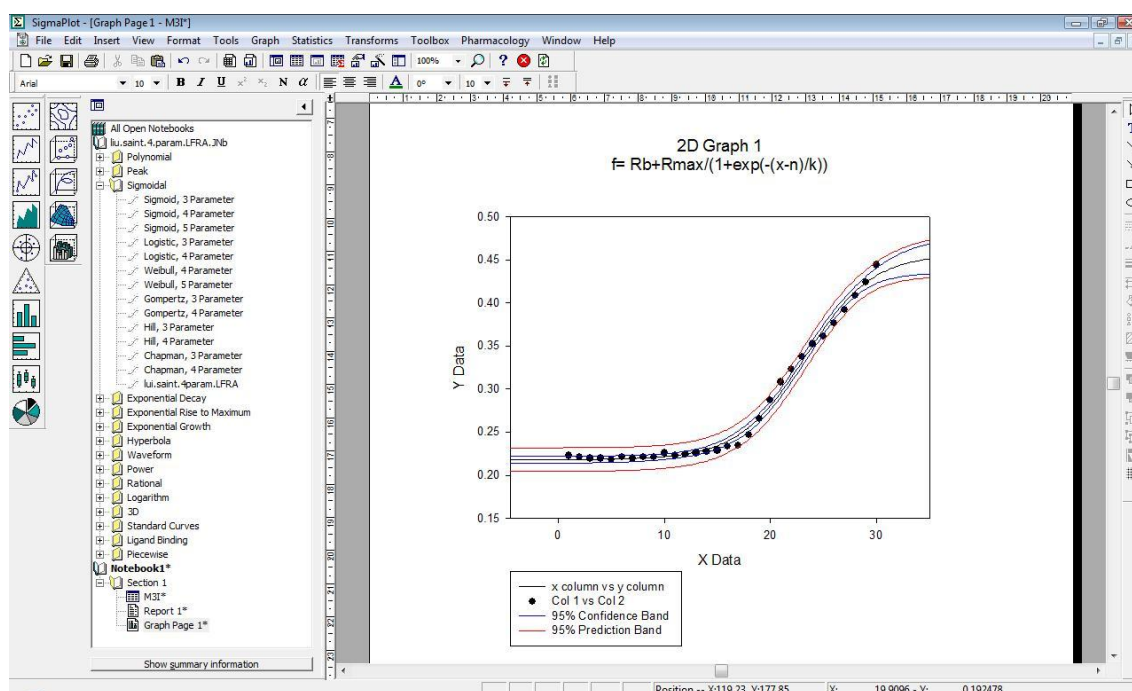


Figura 11. Gráfico en función a la ecuación (4), obtenido por el programa SigmaPlot 10.0 usando los datos de fluorescencia de cada reacción de PCR en tiempo real.

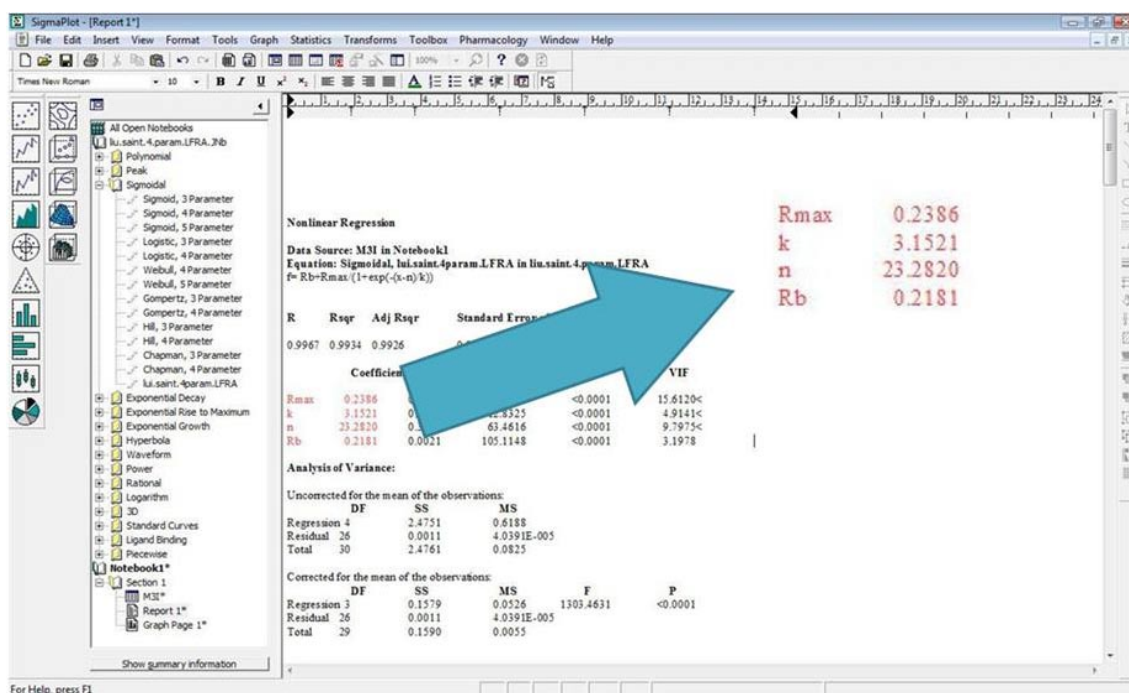


Figura 12. Valores R_{max} , $n_{1/2}$ y k obtenidos a partir del gráfico de la cinética de cada reacción de PCR. SigmaPlot 10.0.

La expresión relativa de un gen es expresado por la relación entre el R_0 del gen Blanco y el R_0 del gen control, según se indica a continuación.

$$\frac{R_{0 \text{ gen X}}}{R_{0 \text{ control}}}$$

5.10. Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados usando el SPSS 17,0 para Windows, mediante pruebas de ANOVA seguido de una prueba de Tukey *post hoc*, para el análisis de los datos fisiológicos y la prueba de Mann-Whitney para el análisis de los datos de radios de expresión RT-PCR en tiempo real; los valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Los resultados son expresados como media \pm SE (error estándar).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Pesos

La diferencia de pesos del ratón, así como los pesos de los testículos y epidídimos son mostrados en la Tabla 3. Existe solo un cambio significativo ($p < 0,05$), en el grupo tratado con el extracto acuoso de maca por 21 días en comparación al control y los otros grupos, mientras que en los grupos de los animales tratados por 7 y 14 días de tratamiento, se puede observar una tendencia al incremento pero no son significativos ($p > 0,05$) (Figura 13). Estas diferencias pueden ser explicadas por las propiedades nutricionales que presenta la maca, ya mencionadas anteriormente (Valentová *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). Por otro lado, se observan también incrementos no significativos ($p > 0,05$) en el peso de los testículos y epidídimos en los ratones tratados en comparación al control (Figura 14).

Tabla 3. Pesos y concentración espermática evaluados en los grupos de animales tratados 7, 14 y 21 días (T7, T14 y T21) con el extracto acuoso de maca y sus respectivos controles (C7, C14 y C21).

	T ₇	C ₇	T ₁₄	C ₁₄	T ₂₁	C ₂₁
n	11	6	8	7	8	7
Dif. peso	0.968±0.219	0.975±0,264	2,098±0,434	1.35±0.104	3,438±0,628*	1.392±0,202
Peso Testíc.	0,098±0,003	0.086±0,004	0,102±0,005	0,092±0,006	0,104±0,005	0,096±0,005
Peso Epidíd.	0.039±0,002	0,034±0,001	0,043±0,002	0.039±0,002	0,045±0,002	0,040±0,002
Conc. Esp. x 10 ⁶	4,832±0,240*	2,548±0,171	5,234±0,171*	3,259±0,495	5,134±0,205*	3,431±0,482

(*) Estadísticamente significativo ($p < 0,05$), comparado al control en cada grupo de tratamiento. Media ± SE; analizado por ANOVA seguida de la prueba Tukey *post hoc*.

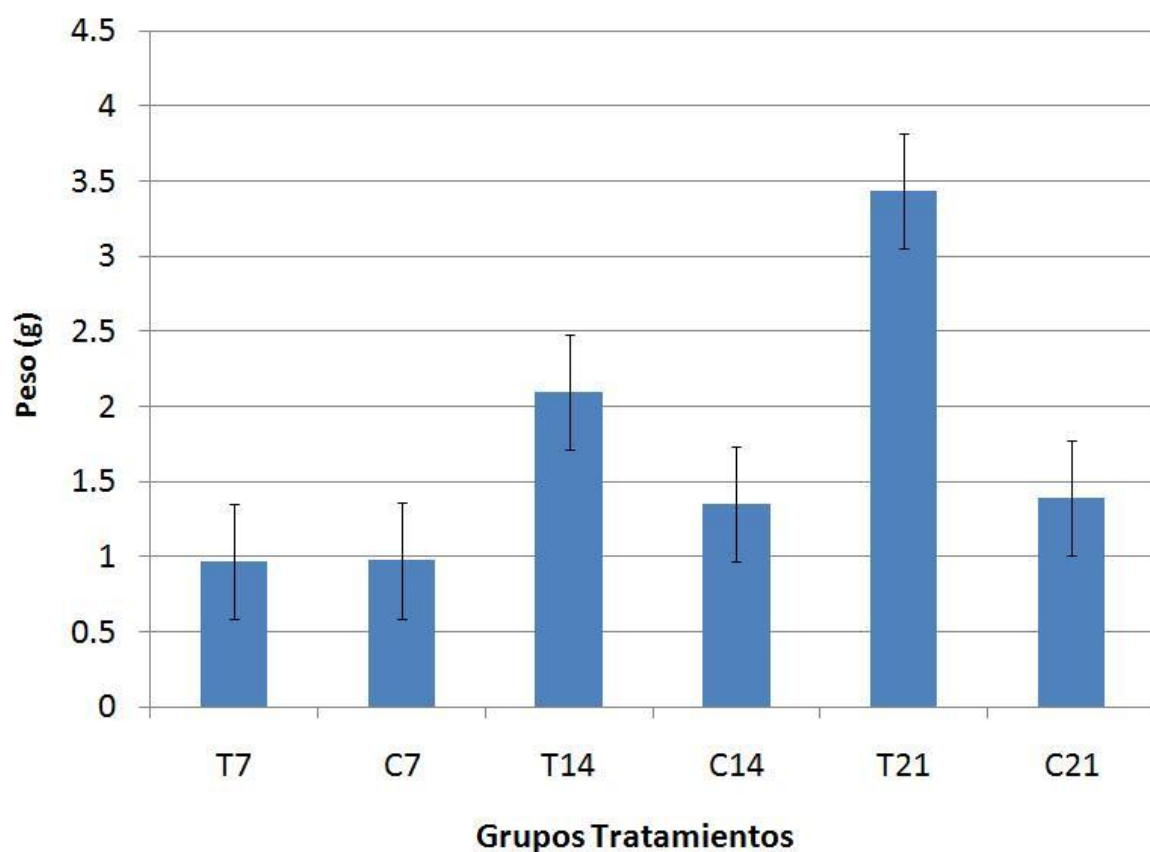


Figura 13. Diferencias de peso corporal en los grupos de animales tratados 7, 14 y 21 días (T7, T14 y T21) con el extracto acuoso de maca y sus controles (C7, C14 y C21). Sólo el grupo con 21 días de tratamiento mostró diferencias significativas ($p < 0,05$), comparado a su respectivo control. ANOVA y prueba Tukey *post hoc*.

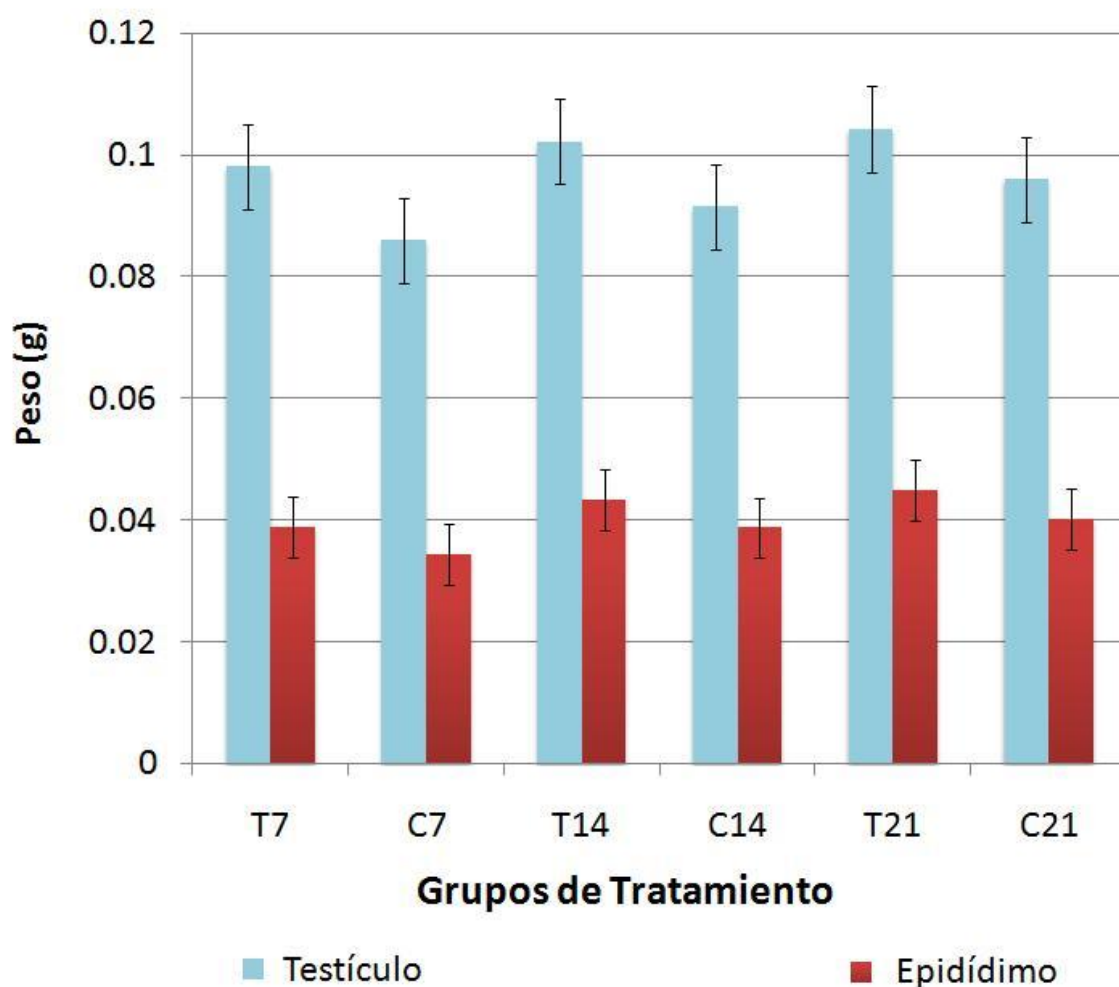


Figura 14. Pesos de testículos y epidídimos en los grupos de animales tratados 7, 14 y 21 días (T7, T14 y T21) con el extracto acuoso de maca y sus controles (C7, C14 y C21). Ningún grupo mostró diferencias significativas ($p > 0,05$), comparados a sus respectivos controles. ANOVA y prueba Tukey *post hoc*.

6.2. Concentración espermática

Los valores de concentración espermática encontrados en el epidídimo de los ratones del control y tratados con el extracto acuoso de maca se presentan en Tabla 3. Se evidenció un incremento significativo ($p < 0,05$) para los grupos de 7, 14 y 21 días de tratamiento con la maca (Figura 15). Estos resultados confirman la capacidad de maca de incrementar la producción de espermatozoides, lo que corrobora lo reportado por diversos investigadores (Gonzales *et al.*, 2001; Gonzales *et al.*, 2003a; Comhaire y Mahmoud, 2004; Bustos-Obregón *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2005; Gonzales, 2005b; Gonzales *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2006a; Gasco *et al.*, 2007).

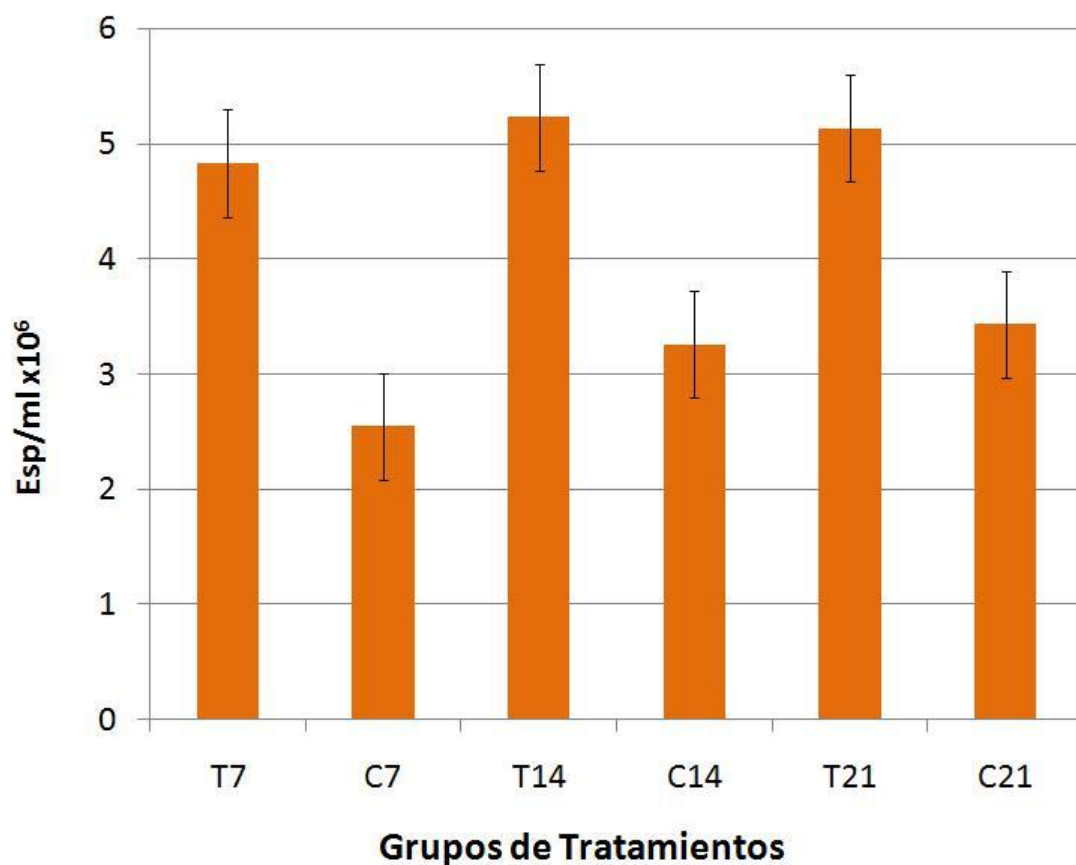


Figura 15. Concentración de espermatozoides en los grupos de animales tratados 7, 14 y 21 días (T7, T14 y T21) con el extracto acuoso de maca y sus controles (C7, C14 y C21). Los 3 grupos tratados mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$), comparados a sus respectivos controles. ANOVA y prueba Tukey *post hoc*.

6.3. Expresión génica

Los valores obtenidos de la cuantificación relativa son mostrados en la Tabla 4. Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) solo en la expresión de *StAR* en los grupos de 7 y 14 días de tratamiento con el extracto acuoso de maca en comparación a sus controles; mientras que no se observa un cambio significativo ($p > 0,05$) en la expresión de los otros genes evaluados (Figura 16), sin embargo, se tienen ciertas tendencias; *Ccna1* tiende a incrementar su expresión ligeramente a los días 7 y 21, mostrando una expresión similar en el día 14 de tratamiento en comparación a su control (Figura 17); *Cyp17* muestra una menor expresión no significativa en los 3 grupos tratados con maca en comparación a sus controles (Figura 18) y *Prm2* se incrementa a los días 7 y 14 de tratamiento con respecto a sus controles (Figura 19), en la figura 20, se presenta en resumen de efecto de la maca sobre la expresión de los 4 genes evaluados.

Tabla 4. Resultados de la cuantificación relativa de la expresión génica de *Ccna1*, *Cyp17*, *StAR* y *Prm2*, en en los grupos de animales tratados 7, 14 y 21 días (T7, T14 y T21) con el extracto acuoso de maca y sus respectivos controles (C7, C14 y C21).

	T ₇	C ₇	T ₁₄	C ₁₄	T ₂₁	C ₂₁
n	10	6	8	7	8	7
$R_0 Ccna1/R_0 Act$	0.217±0.028	0.188±0.019	0.192±0.024	0.189±0.016	0.206±0.021	0.184±0,014
$R_0 Cyp17/R_0 Act$	1.144±0.287	1.325±0.227	1.067±0.260	1.251±0,216	1.059±0.21	1.257±0,238
$R_0 StAR/R_0 Act$	0.469±0.085*	1.227±0.149	0.539±0.251*	1.138±0,079	0.875±0.232	1,047±0,096
$R_0 Prm2/R_0 Act$	12.324±1.982	11.93±2.096	12.986±3.75	11.71±1.748	11.043±3.103	11.81±1.798

(*) Estadísticamente significativo ($p < 0,05$), comparado su control. Media ± SE; analizado prueba de Mann-Whitney.

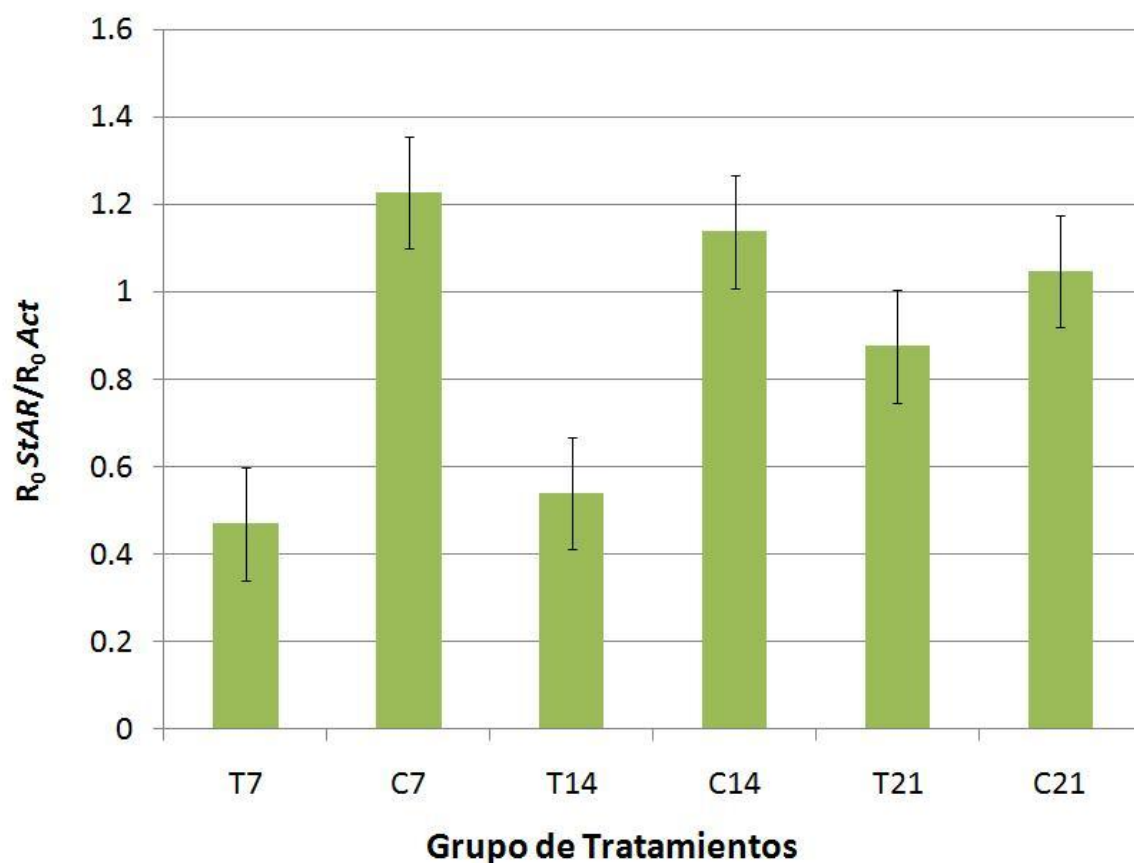


Figura 16. Expresión génica a nivel transcripcional de *StAR* en los grupos de animales tratados 7, 14 y 21 días (T7, T14 y T21) con el extracto acuoso de maca y sus controles (C7, C14 y C21). Los grupos de 7 y 14 días de tratamiento mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$), comparado a sus respectivos controles. Prueba de Mann-Whitney.

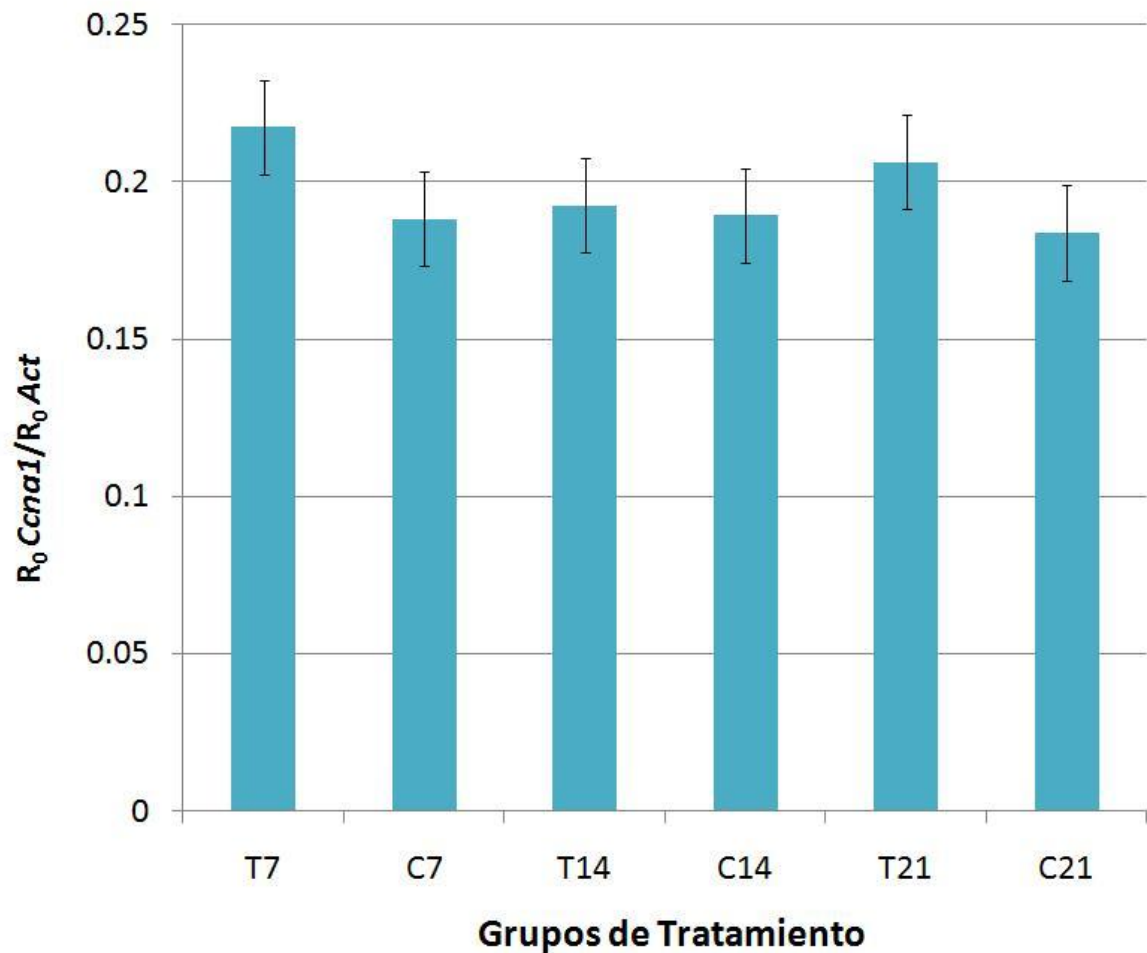


Figura 17. Expresión génica a nivel transcripcional de *Ccna1* en los grupos de animales tratados 7, 14 y 21 días (T7, T14 y T21) con el extracto acuoso de maca y sus controles (C7, C14 y C21). Los 3 grupos no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$), comparados a sus respectivos controles. Prueba de Mann-Whitney.

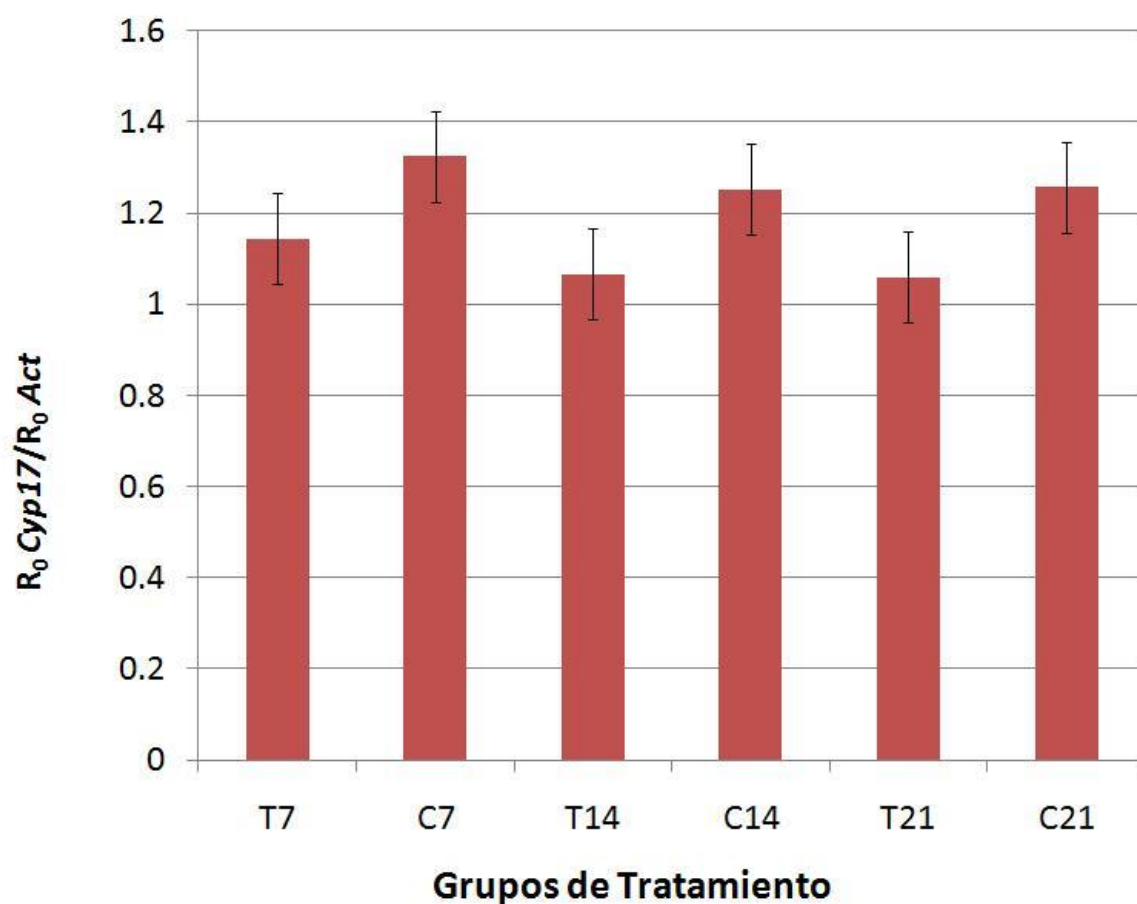


Figura 18. Expresión génica a nivel transcripcional de *Cyp17* en los grupos de animales tratados 7, 14 y 21 días (T7, T14 y T21) con el extracto acuoso de maca y sus controles (C7, C14 y C21). Los 3 grupos no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$), comparados a sus respectivos controles. Prueba de Mann-Whitney.

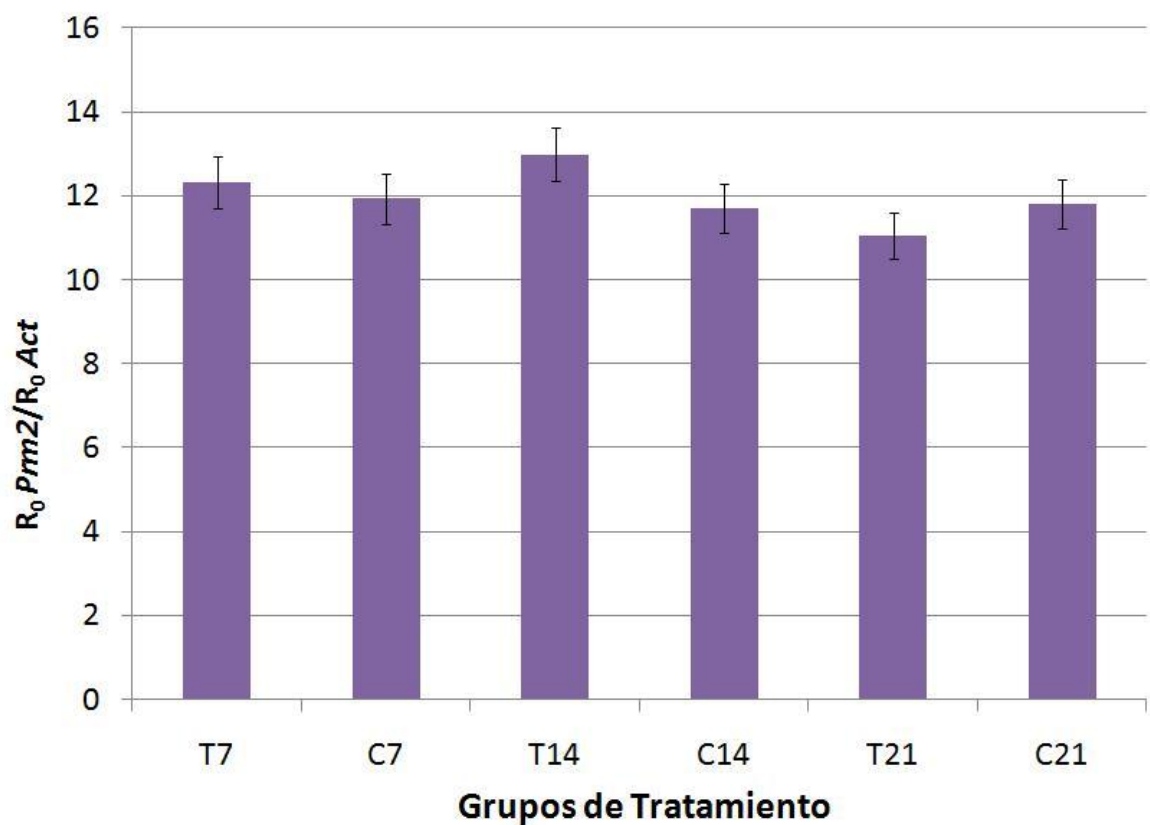


Figura 19. Expresión génica a nivel transcripcional de *Prm2* en los grupos de animales tratados 7, 14 y 21 días (T7, T14 y T21) con el extracto acuoso de maca y sus controles (C7, C14 y C21). Los 3 grupos no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$), comparados a sus respectivos controles. Prueba de Mann-Whitney.

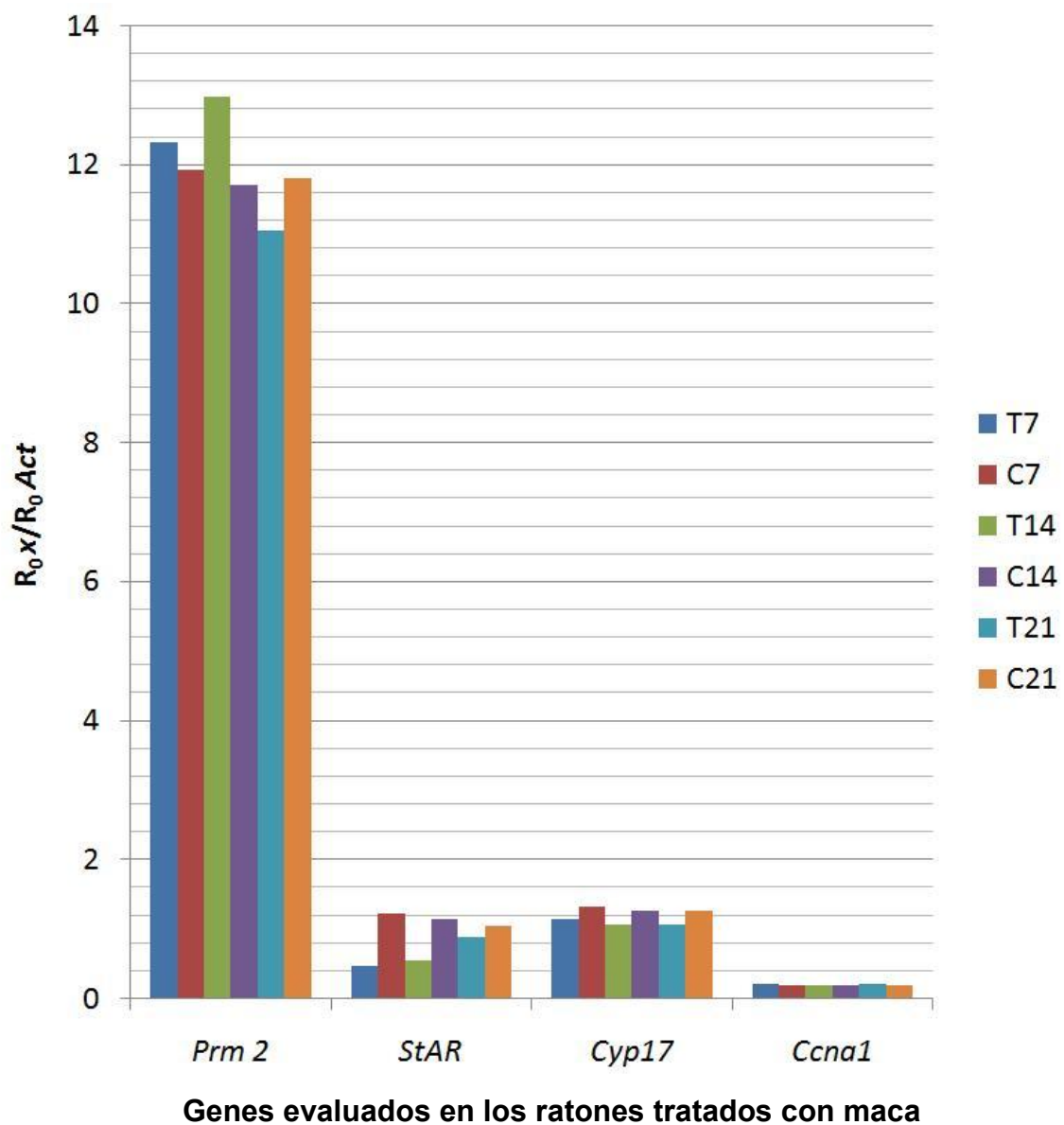


Figura 20. Expresión génica a nivel transcripcional relativa de los 4 genes evaluados en los grupos de animales tratados 7, 14 y 21 días (T7, T14 y T21) con el extracto acuoso de maca y sus respectivos controles (C7, C14 y C21).

Gonzales *et al.*, (2001) propuso que la maca mejora la espermatogénesis en rata, actuando sobre los estadios iniciales IX y XI, donde ocurre la mitosis, estadios en los cuales *Ccna1* es expresado, sin embargo, este gen no está involucrado en el proceso de mitosis; tampoco es probable que *Ccna2* participe ya que este gen es exclusivamente expresado durante la proliferación mitótica antes del ciclo meiótico y durante la fase S pre-meiótica que abarcan principalmente los estadios VII y VIII (Figura 1) (Ravnik y Wolgemuth, 1999), al igual que las ciclinas D1 y D2 que son expresados en espermatogonias redondas en el estadio VIII del epitelio seminífero y cuyos roles están ligados a la regulación del ciclo y la diferenciación de espermatogonias respectivamente (Beumer *et al.*, 2000). Si bien maca estaría incrementando el número de espermatozoides, actuando sobre la mitosis, entonces se esperaría que también la meiosis (un paso intermedio en la producción espermática) se incrementa, lo que no se evidencia en nuestros resultados al observar la falta de expresión diferencial significativa de la *Ccna1*.

Estudios posteriores mostraron que el extracto acuoso de maca, también actúa sobre el estadio de espermiación (VIII) de la espermatogénesis en ratón, a los 7, 14 y 21 días de tratamiento (Bustos-Obregón *et al.*, 2005); por otro lado, en trabajos con ratas se observaron que a los 7 días de tratamiento, también se incrementa los estadios VII y VIII, mientras que a los 14 y 21 días los estadios IX y XI (Gonzales *et al.*, 2004, Chung *et al.*, 2005; Gonzales, 2005b; Rubio *et al.*, 2006a).

Prm2 al estar involucrada directamente al proceso de espermiación (Peschon *et al.*, 1987; Cho *et al.*, 2001; 2003; Grzmil *et al.*, 2008), también es un buen indicador del aumento de esta actividad; el incremento, aunque no significativo, de la expresión de *Prm2* en los 3 grupos tratados con maca sugiere el efecto de esta sobre la espermiogénesis.

Estos efectos sobre la espermiogénesis podrían estar respondiendo a la acción de andrógenos. Algunos investigadores aducen que la maca

incrementa los niveles de testosterona, incentivando de esta manera la producción de espermatozoides (Oshima *et al.*, 2003; Gonzales *et al.*, 2004); sin embargo, nuestros resultados sugieren que maca no induce la síntesis de andrógenos, al no encontrar expresión diferencial significativa de *Cyp17*, importante para la formación de estas hormonas; éstos resultados concuerdan con los encontrados en tratamientos con maca en humanos (Gonzales *et al.*, 2001; Gonzales *et al.*, 2002; Gonzales *et al.*, 2003b) y ratas (Gonzales *et al.*, 2003a), donde no se encontraron diferencias en las hormonas reproductivas, entre ellas la testosterona.

Por otro lado, la disminución significativa de la expresión de *StAR*, en los días 7 y 14 de tratamiento, sugiere una regulación negativa inducido por maca, regulación que respondería a la presencia de andrógenos (Houk *et al.*, 2004) en el extracto acuoso de maca; estos resultados respaldarían la existencia de compuestos con actividades similares a la testosterona (Valentová *et al.*, 2003; Bogani *et al.*, 2006) los cuales aparentemente son los que mejoran la eficacia reproductiva en ratas y humanos (Piacente *et al.*, 2002; Oshima *et al.*, 2003) e incrementan el número de espermatozoides en los túbulos seminíferos (Zheng *et al.*, 2000), lo que se reflejaría en el aumento de espermatozoides en epidídimo encontrado en los tratamientos.

Como se puede observar también en los gráficos la expresión de *StAR* se va recuperando al día 21 de tratamiento en comparación a los días 7 y 14, esto se esperaría debido a que el producto proteico de este gen es muy importante para la síntesis de otras hormonas esteroideas.

El efecto sobre la concentración de espermatozoides en ratones, inducido por maca, no estaría relacionado a un incremento de la actividad meiótica ni a la síntesis de testosterona, partiendo de la falta de expresión transcripcional diferencial significativa de *Ccna1* y *Cyp17* respectivamente, en los ratones tratados sino mas bien a la presencia de compuestos con

actividad androgénica, evidenciado por la regulación negativa en la expresión transcripcional de *StAR* de manera significativa.

Estos resultados revalidan la importancia de maca como potenciador reproductivo masculino, sin correr el riesgo del incremento de testosterona, contraindicado en los casos de cáncer de próstata (Houk *et al.*, 2004).

7. CONCLUSIONES

1. *Lepidium meyenii* Walp. inhibe significativamente la expresión transcripcional de *StAR* evidenciando su actividad androgénica, lo que induce la espermiogénesis con el consecuente incremento de la producción de espermatozoides en ratones.
2. *Lepidium meyenii* Walp. no afecta la expresión del gen *Cyp17*, por lo tanto no induce el incremento de la producción de espermatozoides en ratones mediante el incremento en la síntesis de testosterona.
3. *Lepidium meyenii* Walp no afecta la expresión del gen *Ccna1*, por lo tanto no induce el incremento de la producción de espermatozoides en ratones mediante el aumento en la actividad meiótica.

8. RECOMENDACIÓN

Se recomienda la evaluación de la expresión de otros genes involucrados en el proceso de espermatogénesis principalmente aquellos relacionados a la actividad mitótica como las ciclinas D.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akhtar M; Kelly S; Kaderbhai M. Cytochrome b5 modulation of 17 α -hydroxylase and 17–20 lyase (CYP17) activities in steroidogenesis. *J Endocrinol.* 2005; 187: 267–274.
2. Bäumer N; Sandstede M; Diederichs S; Köhler G; Readhead C; Ji P; Zhang F; Bulk E; Gromoll J; Berdel W; Serve H; Müller-Tidow C. Analysis of the genetic interactions between Cyclin A1, Atm and p53 during spermatogenesis. *Asian J Androl* 2007; 9 (6): 739–750.
3. Beumer T; Roepers-Gajadien H; Gademan I; Kal H; Rooij D. Involvement of the D-Type Cyclins in Germ Cell Proliferation and Differentiation in the Mouse. *Biol Reprod.* 2000; 63: 1893-1898.
4. Bogani P; Simonini F; Iriti M; Rossoni M; Faoro F; Poletti A; Visioli F. *Lepidium meyenii* (Maca) does not exert direct androgenic activities. *J Ethnopharmacol.* 2006; 104: 415-417.
5. Bustos-Obregón E; Diederichs T; Costa del Río F; Sarabia L. Efecto de Malatión y de Maca (*Lepidium meyenii*) sobre la Espermatogenesis del Ratón (*Mus musculus*). *J Braz Soc Ecotoxicol.* 2007; 2(1): 33-38.
6. Bustos-Obregón E; Yucra S; Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice. *Asian J Androl.* 2005; 7(1): 71-76.
7. Chacón G. La Importancia de *Lepidium peruvianum* Chacón sp nov. maca en la Alimentación del ser Humano y Animal 2000 años antes y después de Cristo y en el siglo XXI. Servicios Gráficos Romero. Primera Edición. 1997; 8 (22): 62-71.

8. Cho C; Jung-Ha H; Willis WD; Goulding EH; Stein P; Xu Z; Schultz RM; Hecht NB; Eddy EM. Protamine 2 Deficiency Leads to Sperm DNA Damage and Embryo Death in Mice. *Biol Reprod.* 2003; 69: 211-217.
9. Cho C; Willis WD; Goulding EH; Jung-Ha H; Choi YC; Hecht NB; Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet.* 2001; 28:82–86.
10. Chung F; Rubio J; Gonzales C; Gasco M; Gonazles G. Dose–response effects of *Lepidium meyenii* (maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. *J Ethnopharmacol.* 2005; 98: 143-147.
11. Čikoš Š; Bukovská A; Koppel J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol.* 2007; 8:113.
12. Comhaire FH; Mahmoud A. The role of food supplements in the treatment of the infertile man. *Reprod Biomed Online.* 2003; 7(4):385-91.
13. Corzett M; Mazrimas J; Balhorn R. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev.* 2002; 61:519-527.
14. Dini A; Migliuolo G; Rastrelli L; Saturnino P; Schettino O. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food chemistry.* 1994; 49:347-349.
15. Dötsch J; Nüsken KD; Knerr I; Kirschbaum M; Repp R; Rascher W. Leptin and Neuropeptide Y Gene Expression in Human Placenta: Ontogeny and Evidence for Similarities to Hypothalamic Regulation. *J Clin Endocrinol & Metabol.* 1999; 84(8): 2755-2758.

16. Ferreira I; Do Rosário V; Cravo P. Real-time quantitative PCR with SYBR Green I detection for estimating copy numbers of nine drug resistance candidate genes in *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*. 2006. 5:1.
17. Fix C; Jordan C; Cano P; Walker W. Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *PNAS*. 2004; 101(30): 10919-10924.
18. Gasco M; Aguilar J; Gonzales G. Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium meyenii* (Maca) on reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats. *Andrologia*. 2007; 39: 151–158.
19. Gonzales GF; Ruiz A; Gonzales C; Villegas L; Cordova A. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian J Androl*. 2001; 3(3): 231-3.
20. Gonzales GF; Córdova A; Vega K; Chung A; Villena A; Góñez C; Castillo S. Effect of *Lepidium meyenii* (MACA) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men. *Andrologia*. 2002; 34(6): 367-72.
21. Gonzales GF; Rubio J; Chung A; Gasco M; Villegas L. Effect of alcoholic extract of *Lepidium meyenii* (maca) on testicular function in male rats. *Asian Journal of Andrology*. 2003a; 5(4): 349–352.
22. Gonzales GF; Córdova A; Vega K; Chung A; Villena A; Góñez C. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *Journal of Endocrinology*. 2003b; 176: 163-168.
23. Gonzales GF; Gasco M; Córdova A; Chung A; Rubio J; Villegas L. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in male rats acutely

- exposed to high altitude (4340 m). *Journal of Endocrinology*. 2004; 180(1): 87–95.
24. Gonzales GF; Miranda S; Nieto J; Fernández G; Yucra S; Rubio J; Yi P; Gasco M. Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005a; 3: 5.
 25. Gonzales G. Biological Effects of *Lepidium meyenii*, Maca, a Plant from the Highlands of Peru. 2005b. *Recent Progress in Medicinal Plants Vol.15–Natural Products*.
 26. Gonzales G; Nieto J; Rubio J; Gasco M. Effect of Black maca (*Lepidium meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats. *Andrologia*. 2006; 38: 166-172.
 27. Gonzales GF; Vasquez V; Rodriguez D; Maldonado C; Mormontoy J; Portella J; Pajuelo M; Villegas L, Gasco M. Effect of two different extracts of red maca in male rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia. *Asian J Androl*. 2007; 9(2): 245-51.
 28. Grzmil P; Boinska D; Kleene K; Adham I; Schlüter G; Kämper M; Buyandelger B; Meinhardt A; Wolf S; Engel W. Prm3, the Fourth Gene in the Mouse Protamine Gene Cluster, Encodes a Conserved Acidic Protein That Affects Sperm Motility. *Biol reprod*. 2008; 78: 958–967.
 29. Houk CP; Pearson E; Martinelle N; Donahoe P; Teixeira J. Feedback Inhibition of Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression in Vitro and in Vivo by Androgens. *Endocrinol*. 2004; 145(3): 1269-1275.
 30. Johnston DS; Russell LD; Friel PJ; Griswold MD. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis

following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinol.* 2001; 142: 2405-2408.

31. Lele K; Wolgemuth D. Distinct Regions of the Mouse Cyclin A1 Gene, *Ccna1*, Confer Male Germ-Cell Specific Expression and Enhancer Function. *Biol Reprod.* 2004; 71: 1340-1347.
32. Liu D; Liao C; Wolgemuth D. A Role for Cyclin A1 in the Activation of MPF and G2–M Transition during Meiosis of Male Germ Cells in Mice. *Develop Biol.* 2000; 224: 388 – 400.
33. Liu D; Matzuk M; Kong Sung W; Guo Q; Wang P; Wolgemuth D. Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat genet.* 1998; 20: 377-380.
34. Liu W; Saint D. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Communications.* 2002a; 294: 347–353.
35. Liu W; Saint D. A New Quantitative Method of Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Based on Simulation of Polymerase Chain Reaction Kinetics. *Anal Biochem.* 2002b; 302(1): 52-59.
36. Liu Y; Yao ZX; Bendavid C; Borgmeyer C; Han Z; Cavalli LR; Chan WY; Folmer J; Zirkin BR; Haddad BR; Gallicano GI; Papadopoulos V. Haploinsufficiency of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase/17,20 Lyase (CYP17) Causes Infertility in Male Mice. *Mol Endocrinol.* 2005a; 19(9):2380-2389.
37. Liu Y; Yao ZX; Papadopoulos V. Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase/17,20 Lyase (CYP17) Function in Cholesterol

Biosynthesis: Identification of Squalene Monooxygenase (Epoxidase) Activity Associated with CYP17 in Leydig Cells. *Mol Endocrinol.* 2005b; 19(7): 1918-1931.

38. Livak K; Schmittgen T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods* 2001; 25: 402–408.
39. McLachlan RI; Wreford NG; Meachem SJ; DeKretser DM; Robertson DM. Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat. *Biol Reprod.* 1994; 51:945-955.
40. McLachlan RJ; Wreford NG; O'Donnell L; Kretser DM; Robertson DM. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J. of Endocrinology.* 1996; 148: 1-9.
41. Muhammad I; Zhao J; Dunbar DC; Khan IA. Constituents of *Lepidium meyenii* “maca”. *Phytochemistry* 2002; 59: 105–10.
42. O'Donnell L; McLachlan RI; Wreford NG; Robertson DM. Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology.* 1994; 135:2608-2614.
43. Obregón L. Maca. *Planta Medicinal y Nutritiva del Perú.* Instituto de Fitoterapia Americano, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 1998; 182.
44. O'Donnell L; McLachlan R; Wreford NG; de Kretser DM; Robertson DM. Testosterone Withdrawal Promotes Stage-Specific Detachment of Round Spermatids from the Rat Seminiferous Epithelium. *Biol of Reprod.* 1996; 55: 895-901.

45. Oliva R. Protamines and male infertility. *Human Reprod.* 2006; 12 (4): 417- 435.
46. Oshima M; Gu Y; Tsukada S. Effects of *Lepidium meyenii* Walp and *Jatropha macrantha* on blood levels of Estradiol-17 β , Progesterone, Testosterone and the rate of embryo implantation in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 2003; 65(10): 1145-1146.
47. Peirce S; Chen W. Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer cell lines by real time RT-PCR. *J of Endocrinol.* 2001; 171: R1–R4.
48. Peschon J; Behringert R; Brinster R; Palmiter R. Spermatid-specific expression of protamine 1 in transgenic mice. *Devel Biol.* 1987; 84: 5316-5319.
49. Piacente S; Carbone V; Plaza A; Zampelli A; Pizza C. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50:5621–5625.
50. Print CG; Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays.* 2000; 22:423-430.
51. Ravnik SE; Wolgemuth DJ. Regulation of meiosis during mammalian spermatogenesis: the A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases are differentially expressed in the germ-cell lineage. *Dev Biol* 1999; 207:408–418.
52. Rhim J; Connor W; Dixon G; Harendza C; Evenson D; Palmiter R; Brinster R. Expression of an Avian Protamine in Transgenic Mice

Disrupts Chromatin Structure in Spermatozoa. *Biol reprod.* 1995; 52: 20-32.

53. Rubio J; Riqueros MI; Gasco M; Yucra S; Miranda S; Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced damage on reproductive function in male rats. *Food Chem Toxicol.* 2006a; 44(7):1114-22.
54. Rubio J; Caldas M; Dávila S; Gasco M; Gonzales GF. Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (Maca) on learning and depression in ovariectomized mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2006b; 6: 23.
55. Ruiz-Luna AC; Salazar S; Aspajo NJ; Rubio J; Gasco M; Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) increases litter size in normal adult female mice *Reproductive Biol Endocrinol.* 2005; 3:16
56. Sandoval M; Okuhama N; Angeles F; Melchor V; Candezo L; Lao J; Miller M. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry.* 2002; 79: 207-213.
57. Schefe J; Lehmann K; Buschmann I; Unger T; Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. *J Mol Med.* 2006; 84:901–910.
58. Schostak M; Krause H; Miller K; Schrader M; Weikert S; Christoph F; Kempkensteffen C; Kollermann J. Quantitative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. *BMC Urology.* 2006; 6:7.

59. Schulz R; Paris F; Lembke P; Blum V. Testosterone Immunoreactivity in the Seminiferous Epithelium of Rat Testis: Effect of Treatment with Ethane Dimethanesulfonate. *J Histochem Cytochem* 1989; 37:1667-1673.
60. Shi Z; Zhang H; Liu Y; Xu M; Dai J. Alterations in Gene Expression and Testosterone Synthesis in the Testes of Male Rats Exposed to Perfluorododecanoic Acid. *Toxicol Sci.* 2007; 98(1): 206–215.
61. Solis J; Medrano G; Ghislain M. Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *J Plant Physiol.* 2007; 164(8): 1071-82.
62. Steuerwald N; Cohen J; Herrera R; Brenner C. Quantification of mRNA in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT–PCR. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6(5): 448–453.
63. Stocco DM. Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol.* 2001; 15:1245-1254.
64. Sweeney C; Murphy M; Kubelka M; Ravnik SE; Hawkins CF; Wolgemuth DJ; Carrington M. A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Develop.* 1996; 122:53–64.
65. Tanaka H; Miyagawa Y; Tsujimura A; Matsumiya K; Okuyama A; Nishimune Y. Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9 (2): 69-73.
66. Valentová K; Ulrichová J. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* - prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases.

Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2003 Dec;147(2):119-30.

67. Van der Meer T; Chan W; Palazon L; Nieduszynski C; Murphy M; Sobczak-Thépot J; Carrington M; Colledge W. Cyclin A1 protein shows haplo-insufficiency for normal fertility in male mice Reproduc. 2004; 127: 503-511.
68. Wang Y; Wang Y; McNeil B; Harvey LM. Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. Food Research International. 2007; 40: 783-792.
69. Wolgemuth D; Lele K; Jobanputra V; Salazar G. The A-type cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells. inter J androl. 2004; 27:192-199.
70. Zhang X; Ding L; Sandford A. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. BMC Mol Biol. 2005; 6:4.
71. Zhao J; Muhammad I; Dunbar DC; Mustafa J; Khan IA. New alkamides from maca (*Lepidium meyenii*). J Agric Food Chem. 2005; 53(3):690-3.
72. Zheng BL; He K; Kim CH; Rogers L; Shao Y; Huang ZY; Lu Y; Yan SJ; Qien LC; Zheng QY. Effect of a lipidic extract for *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. Urology. 2000; 55 (4):598-602.
73. Zhou Q; Shima JE; Nie R; Friel PJ; Griswold MD. Androgen-Regulated Transcripts in the Neonatal Mouse Testis as Determined Through Microarray Analysis. Biol of Reprod. 2005; 72: 1010–1019.

74. Zipper H; Brunner H; Bernhagen J; Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32: 1-10.